



**Helder Alexandre
Neto Marques**

**Potencial acidogénico de resíduos para produção
de biopolímeros**



**Helder Alexandre
Neto Marques**

**Potencial acidogénico de resíduos para produção
de biopolímeros**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, realizada sob a orientação científica do Prof. Doutora Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela, Professora Associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Doutora Ana Isabel Couto Neto da Silva Miranda

Professora Doutora do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Cheng Chia-Yau

Professor Doutor da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Professora Doutora Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela

Professora Doutora do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que de alguma que colaboraram na execução deste estudo. Não podendo mencionar todos, agradeço particularmente à minha orientadora professora Isabel Capela; e a Flávio Silva e João Sousa que colaboram ao longo de todos os trabalhos.

Lembro ainda os colegas de laboratório nesta fase final, e os colegas e professores que em algum momento me acompanharam neste percurso académico.

Tenho de referir também os meus pais, não pela contribuição para esta dissertação em particular, mas por terem possibilitado que eu chegasse até esta fase.

palavras-chave

Ácidos orgânicos Voláteis (AOVs) Acidogénese, Digestão anaeróbia, *Batch*, Biopolímeros, Polihidroxialcanoatos (PHAs).

resumo

Este estudo centrou-se na manipulação das condições operatórias da digestão anaeróbia com vista a encontrar as condições óptimas para a produção de ácidos orgânicos voláteis (AOVs), durante a etapa de acidogénese. Está dividido em três fases, e em cada fase foram realizados vários ensaios em reactores *batch*. Os substratos utilizados foram: soro de leite, glicerol, efluente vínico, efluente de lagares de azeite e fracção orgânica de resíduos sólidos urbanos (FORSU).

A Fase I teve o objectivo de determinar concentração óptima de ácido 2-Bromoethanesulfonic (BES) para inibir a metanogénese da digestão anaeróbia. Foram experimentados dois tipos de inóculo distintos, tendo-se concluído que 1mM/L de BES inibe totalmente a metanogénese com qualquer dos dois inóculos.

A Fase II teve como objectivo a determinação das condições operacionais óptimas para a produção de AOVs, para o substrato soro de leite. As variáveis foram o rácio alimento/microrganismos (F/M) e a alcalinidade.

Através da metodologia de superfície de resposta conclui-se que rácio F/M igual a 4 (quatro) e alcalinidade de 2 gHCO₃⁻/L são as melhores condições para a produção de AOVs. A metanogénese foi inibida com 1mM/L de BES, nesta fase e na seguinte.

Na Fase III testou-se a produção de AOVs com vários substratos, utilizando as três melhores condições operacionais encontradas na fase anterior. Nestas condições verificou-se que o efluente vínico se destaca pelo seu potencial para produzir AOVs e em particular ácido acético. Os substratos soro de leite e efluente vínico foram os que demonstraram ser mais facilmente acidificáveis, com 100% e 65% de acidificação, respectivamente.

keywords

Volatile fatty acids (VFAs), Acidogenesis, Anaerobic digestion, Batch, Biopolymers, Polyhydroxyalkanoate (PHAs).

abstract

This study focused on the manipulation of operating conditions of anaerobic digestion in order to find the optimal conditions for the production of volatile fatty acids (VFAs), during the stage of acidogenesis. It is divided into three phases and in each phase several tests were carried out in batch reactors. The substrates used were whey, glycerol, wine effluent, effluent from oil mills and organic fraction of municipal solid waste.

Phase I was aimed at determining optimal concentration of 2-Bromoethanesulfonic (BES) to inhibit methanogenesis of anaerobic digestion. It was tested two different types of inoculum. It was concluded that 1 mM BES/L completely inhibits methanogenesis with any of the two inocula.

Phase II is angled towards ascertaining optimum operating conditions for the production of VFAs, with whey. The variables were the ratio food/microorganisms (F/M) and alkalinity.

Through response surface methodology it was concluded that the ratio F/M equal to 4 (four) and alkalinity of 2 gHCO₃⁻/L are the best conditions for the production of VFAs. Methanogenesis was inhibited with BES 1mM/L, at this phase and the following one.

In Phase III the production of VFAs was tested with various substrates, using the three best operating conditions found in the previous phase. It was found that the wine effluent stands out for its potential to produce VFAs and particularly acetic acid. The substrates whey and wine effluent were shown to be more easily to acidify, with 100% and 65% for acidification, respectively.

Índice

Índice	I
Índice de figuras	III
Índice de tabelas	IV
Lista de abreviaturas	V
Nomenclatura	VI
1. Introdução	1
1.1. Valorização de efluentes orgânicos	1
1.2. Valorização de efluentes orgânicos para produção de biopolímeros	1
1.3. Produção de ácidos orgânicos voláteis	4
2. Tratamento biológico anaeróbio.....	6
2.1. Hidrólise	6
2.2. Acidogénese	6
2.3. Metanogénese	7
3. Objectivos.....	8
4. Procedimento experimental	9
4.1. Montagem experimental.....	9
4.2. Condições operatórias.....	10
4.2.1. Inóculo	10
4.2.2. Temperatura	10
4.2.1. Agitação	10
4.2.2. Alcalinidade.....	10
4.2.3. Nutrientes.....	11
4.3. Substratos utilizados	11
4.3.1. Soro de Leite.....	11
4.3.2. Glicerol.....	12
4.3.3. Efluente Vínico.....	12
4.3.4. Fracção Orgânica de Resíduos Sólidos Urbanos	12
4.3.5. Efluente de Lagares de Azeite.....	13
4.3.6. Caracterização dos Substratos.....	13
4.4. Parâmetros analisados.....	14
4.4.1. Carência Química de Oxigénio (CQO)	14
4.4.2. Biogás	15
4.4.3. pH.....	15
4.4.4. Ácidos Orgânicos Voláteis	15
4.4.5. Sólidos	16
4.5. Condições de arranque e monitorização dos ensaios	16
4.5.1. Inibição da Metanogénese – Fase I.....	16
4.5.1.1. Monitorização na Fase I.....	17
4.5.2. Optimização da Acidogénese – Fase II	18
4.5.2.1. Monitorização na Fase II	20
4.5.3. Avaliação do potencial acidogénico de vários substratos – Fase III	20
4.5.3.1. Monitorização na Fase III	21
4.5.4. Quadro comparativo das três fases.....	21
5. Apresentação e discussão dos resultados	23

5.1. Inibição da metanogénese - Fase I	23
5.1.1. Inibição da metanogénese com inóculo "Salgueiro"	23
5.1.1. Inibição da metanogénese com inóculo "Simria"	24
5.1.1. Considerações Finais	26
5.2. Optimização da acidogénese para o soro de leite - Fase II	26
5.2.1. Resultados dos ensaios com rácio F/M=1	26
5.2.2. Resultados dos ensaios com rácio F/M=2	29
5.2.3. Resultados dos ensaios com rácio F/M=3	32
5.2.4. Resultados dos ensaios com rácio F/M=4	34
5.2.1. Superfícies de resposta	37
5.3. Potencial acidogénico de vários substratos - Fase III	40
5.3.1. Glicerol	41
5.3.2. Soro de Leite	43
5.3.3. Efluente vínico	46
5.3.4. Fracção orgânica de resíduos sólidos urbanos (FORSU)	49
5.3.5. Efluente de lagares de azeite	51
5.3.6. Sem substrato	52
5.3.1. Grau de acidificação nos vários substratos - Fase III	54
6. Conclusões	56
6.1. Conclusões	56
6.1.1. Inibição da Metanogénese – Fase I	56
6.1.2. Optimização da acidogénese – Fase II	56
6.1.3. Avaliação do potencial acidogénico de vários substratos – Fase III	57
6.2. Limitações do trabalho e sugestões	57
Referencias bibliográficas	59
Anexos	64
Inibição da metanogénese - Fase I	64
Cracterização dos inóculos	64
Composição inicial detalhada dos ensaios preparados – Fase I	64
Sólidos no final da digestão	65
Optimização da acidogénese com soro de leite - Fase II	66
Caracterização do Inóculo	66
Composição inicial detalhada dos ensaios preparados – Fase II	66
Análise ao Biogás	67
Sólidos Finais	68
Potencial acidogénico de vários substratos - Fase III	70
Caracterização do Inóculo	70
Caracterização dos Substratos	70
Composição inicial detalhada dos ensaios preparados – Fase III	71
Análise ao Biogás	72
Sólidos Finais	74

Índice de figuras

Figura 1 - Garrafas Oxitop® IS 6 completo com sensores de pressão e placa de agitação	9
Figura 2 - Garrafas Oxitop® com placa de agitação, sem sensores de pressão, em estufa	9
Figura 3 - Composição da FORSU simulada em base tal e qual	13
Figura 4 - Exemplo de um cromatograma resultante de uma análise de amostra de AOVs	15
Figura 5 - Concentrações de BES testadas - Fase I.....	17
Figura 6 - Rácio F/M e Alcalinidade de cada ensaio – Fase II	19
Figura 7 - SST e SSV finais nos ensaios com o inóculo “Salgueiro” – Fase I.....	23
Figura 8 - Variação de volume de biogás nos ensaios com o inóculo “Salgueiro” – Fase I.....	24
Figura 9 - SST e SSV finais nos ensaios com o inóculo “Simria” – Fase I.....	25
Figura 10 - Variação de volume de biogás nos ensaios com o inóculo “Simria” – Fase I.....	25
Figura 11 - pH nos ensaios com rácio F/M= 1 – Fase II	26
Figura 12 - SSV e SST final nos ensaios com rácio F/M=1 - Fase II	27
Figura 13 - Concentração de AOVs nos ensaios com razão F/M=1	28
Figura 14 - pH nos ensaios com rácio F/M= 2 – Fase II	29
Figura 15 - SSV e SST finais nos ensaios com rácio F/M=2 - Fase II.....	30
Figura 16 - Concentração de AOVs nos ensaios com razão F/M=2	31
Figura 17 - pH nos ensaios com rácio F/M= 3 – Fase II.....	32
Figura 18 - SSV e SST finais nos ensaios com rácio F/M=3 - Fase II.....	32
Figura 19 - Concentração de AOVs nos ensaios com razão F/M=3	34
Figura 20 - pH nos ensaios com rácio F/M= 4 – Fase II.....	35
Figura 21 - SSV e SST finais nos ensaios com rácio F/M=4 - Fase II.....	35
Figura 22 - Concentração de AOVs nos ensaios com razão F/M=4	37
Figura 23 - Superfície de resposta para a concentração Max. de AOVs – Fase II	38
Figura 24 - Superfície de resposta para o grau de acidificação	39
Figura 25 - Superfície de resposta para % AOVs úteis na produção de biopolímeros	40
Figura 26 - pH nos ensaios com substrato glicerol – Fase III.....	41
Figura 27 - SSV e SST finais nos ensaios com glicerol - Fase III	42
Figura 28 - Concentração de AOVs nos ensaios com glicerol	43
Figura 29 - pH nos ensaios com substrato soro de leite – Fase III.....	44
Figura 30 - SSV e SST final nos ensaios com soro de leite - Fase III.....	44
Figura 31 - Concentração de AOVs nos ensaios com soro de leite	45
Figura 32 - pH nos ensaios com efluente vínico – Fase III.....	46
Figura 33 - SSV e SST finais nos ensaios com efluente vínico - Fase III.....	47
Figura 34 - Concentração de AOVs nos ensaios com efluente vínico.....	48
Figura 35 - pH nos ensaios com FORSU – Fase III.....	49
Figura 36 - SSV e SST finais nos ensaios com FORSU - Fase III	49
Figura 37 - Concentração de AOVs nos ensaios com FORSU	50
Figura 38 - pH nos ensaios com efluente de lagares de azeite – Fase III.....	51
Figura 39 - SSV e SST nos ensaios com efluente de lagares de azeite - Fase III.....	51
Figura 40 - Concentração de AOVs nos ensaios com efluente vínico.....	52
Figura 41 - pH nos ensaios sem substrato (brancos) – Fase III.....	53
Figura 42 - SSV e SST finais nos ensaios sem substrato (brancos) - Fase III.....	53
Figura 43 - Concentração de AOVs nos ensaios sem substrato (brancos).....	54
Figura 44 - Grau de acidificação dos vários substratos.....	55

Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição e concentração das soluções de nutrientes adicionadas	11
Tabela 2 - Caracterização dos substratos utilizados	14
Tabela 3 - Características particulares de cada ensaio - Fase III	20
Tabela 4 - Quadro comparativo das três fases	21
Tabela A.1 - Sólidos SST e SSV dos Inóculos “Simria” I e “Salgueiro”	64
Tabela A.2 - Composição inicial de cada ensaio em volume - Fase I	64
Tabela A.3 - Sólidos finais nos ensaios com Inóculo “Salgueiro” I	65
Tabela A.4 - Sólidos finais nos ensaios com Inóculo “Simria”	65
Tabela A.5 - Sólidos SST e SSV do Inóculo “Simria” II	66
Tabela A.6 - Composição inicial de cada ensaio em volume - Fase II	66
Tabela A.7 - Biogás nos ensaios com razão F/M=1 e alcalinidades de 0 a 6 g/L – Fase II	67
Tabela A.8 - Biogás nos ensaios com razão F/M=2 e alcalinidades de 0 a 6 g/L – Fase II	67
Tabela A.9 - Biogás nos ensaios com razão F/M=3 e alcalinidades de 0 a 6 g/L – Fase II	67
Tabela A.10 - Biogás nos ensaios com razão F/M=4 e alcalinidades de 0 a 6 g/L – Fase II	68
Tabela A.11 - Sólidos final nos ensaios F/M=1 - Fase II	68
Tabela A.12 - Sólidos final nos ensaios F/M=2 - Fase II	68
Tabela A.13 - Sólidos final nos ensaios F/M=3 - Fase II	68
Tabela A.14 - Sólidos final nos ensaios F/M=4 - Fase II	69
Tabela A.15 - Sólidos SST e SSV do Inóculo “Simria” II	70
Tabela A.16 - Caracterização dos substratos (CQO) pelo método refluxo aberto	70
Tabela A.17 - Composição inicial de cada ensaio em volume - Fase III	71
Tabela A.18 - Biogás nos ensaios com o substrato glicerol – Fase III	72
Tabela A.19 - Biogás nos ensaios com o substrato soro de leite – Fase III	72
Tabela A.20 - Biogás nos ensaios com o substrato efluente vínico – Fase III	72
Tabela A.21 - Biogás nos ensaios com o substrato FORSU – Fase III	73
Tabela A.22 - Biogás nos ensaios com o substrato efluente de lagares azeite – Fase III	73
Tabela A.23 - Biogás nos ensaios sem substrato (brancos) – Fase III	73
Tabela A.24 - Sólidos final nos ensaios com glicerol - Fase III	74
Tabela A.25 - Sólidos final nos ensaios com soro de leite - Fase III	74
Tabela A.26 - Sólidos final nos ensaios com efluente vínico - Fase III	74
Tabela A.27 - Sólidos final nos ensaios com FORSU - Fase III	74
Tabela A.28 - Sólidos final nos ensaios com FORSU - Fase III	74
Tabela A.29 - Sólidos final nos ensaios com FORSU - Fase III	75

Lista de abreviaturas

Alk	- Alcalinidade
AOVs	- Ácidos orgânicos voláteis
BES	- 2-Bromoethanesulfonic Acidsodium salt
CQO	- Carência química de oxigénio
CMM	- Cultura microbiana mista
FAS	- Sulfato ferroso amoniacal
FORSU	- Fracção orgânica de Resíduos Sólidos Urbanos
F/M	- Razão alimento/ microrganismos
HCO ₃ ⁻	- Ião bicarbonato
PHAs	- Polihidroxiálcanoatos
RSM	- <i>Response Surface Methology</i>
SST	- Sólidos suspensos totais
SSV	- Sólidos suspensos voláteis
SV	- Sólidos voláteis
ST	- Sólidos totais

Nomenclatura

- E-1-0 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=1 e Alcalinidade 0 gHCO₃⁻/L
- E-1-2 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=1 e Alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L
- E-1-4 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=1 e Alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L
- E-1-6 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=1 e Alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L
- E-2-0 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=2 e Alcalinidade 0 gHCO₃⁻/L
- E-2-2 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=2 e Alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L
- E-2-4 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=2 e Alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L
- E-2-6 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=2 e Alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L
- E-3-0 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=3 e Alcalinidade 0 gHCO₃⁻/L
- E-3-2 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=3 e Alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L
- E-3-4 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=3 e Alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L
- E-3-6 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=3 e Alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L
- E-4-0 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=4 e Alcalinidade 0 gHCO₃⁻/L
- E-4-2 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=4 e Alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L
- E-4-4 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=4 e Alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L
- E-4-6 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=4 e Alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L
- G-4-4 - Ensaio com substrato glicerol, Rácio F/M=4 e Alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L
- G-4-2 - Ensaio com substrato glicerol, Rácio F/M=4 e Alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L
- G-3-6 - Ensaio com substrato glicerol, Rácio F/M=3 e Alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L
- S-4-4 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=4 e Alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L
- S-4-2 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=4 e Alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L
- S-3-6 - Ensaio com substrato soro de leite, Rácio F/M=3 e Alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L
- V-4-4 - Ensaio com substrato efluente vínico, Rácio F/M=4 e Alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L
- V-4-2 - Ensaio com substrato efluente vínico, Rácio F/M=4 e Alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L
- V-3-6 - Ensaio com substrato efluente vínico, Rácio F/M=3 e Alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L
- F-4-4 - Ensaio com substrato FORSU, Rácio F/M=4 e Alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L
- F-4-2 - Ensaio com substrato FORSU, Rácio F/M=4 e Alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L
- F-3-6 - Ensaio com substrato FORSU, Rácio F/M=3 e Alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L
- L-4-4 - Ensaio com substrato efl. de lagares de azeite, Rácio F/M=4 e Alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L
- L-4-2 - Ensaio com substrato efl. de lagares de azeite, Rácio F/M=2 e Alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L
- B-0-4 - Ensaio sem substrato (branco), e Alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L
- B-0-2 - Ensaio sem substrato (branco), e Alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L
- B-0-6 - Ensaio sem substrato (branco), e Alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L

1. INTRODUÇÃO

A presente dissertação enquadra-se numa investigação mais alargada que tem o objectivo de produzir biopolímeros utilizando matérias-primas de baixo custo, como os efluentes industriais. Esta investigação contribui para o desenvolvimento de uma tecnologia de tratamento biológico de águas residuais e resíduos orgânicos capaz de produzir sub-productos altamente valorizáveis, como a produção de biopolímeros.

1.1. VALORIZAÇÃO DE EFLUENTES ORGÂNICOS

Uma sociedade sustentável requer uma redução da dependência de combustíveis fósseis assim como uma diminuição da poluição que é gerada pelas diferentes actividades. O tratamento de águas residuais é uma área em que estes dois objectivos podem ser atingidos simultaneamente. Neste sentido, muitos processos de tratamento biológico podem produzir energia ou químicos com elevado valor enquanto simultaneamente se atinge o objectivo de controlar a poluição. Este estudo vai focar o processo de tratamento, alterando-o para produzir materiais com elevado valor e ecológicos, em vez de focar a qualidade do efluente tratado. Assim, é feita uma tentativa neste projecto de redireccionar os processos biológicos em direcção a outros produtos finais, tais como os polihidroxialcanoatos (PHAs).

1.2. VALORIZAÇÃO DE EFLUENTES ORGÂNICOS PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são biopolímeros (poliésteres) biodegradáveis sintetizados principalmente por bactérias, utilizados por estas como materiais de armazenamento intracelular de carbono e energia (Anderson, 1990). Nas últimas três décadas, os PHAs têm atraído interesse industrial como polímero biodegradável, não só por causa das suas propriedades compatíveis com as dos polímeros sintéticos, mas também porque os PHAs podem ser sintetizados a partir de recursos renováveis, como os resíduos agrícolas ou industriais (Braunegg et al, 2000), permitindo assim um baixo impacto ambiental em comparação com os poliésteres convencionais sintetizados quimicamente.

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) apresentam um elevado potencial de substituição de polímeros convencionais pelas suas interessantes qualidades termoplásticas. Dependendo do tipo e proporção relativa dos monómeros, estes biopolímeros apresentam uma ampla gama de propriedades estruturais, térmicas e mecânicas.

Devido a estas características únicas dos PHAs, vários tipos de estirpes de bactérias têm sido testadas quanto à sua capacidade de produzir PHAs. Até a data há mais de 300 microrganismos diferentes capazes de sintetizar PHAs (Lee, 1996). Podem ser atingidos altos conteúdos em PHAs usando processos de fermentação com culturas puras (Adeline et al, 2003). No entanto, apesar dos esforços depositados no desenvolvimento de processos de fermentação (acidogénese) de culturas microbiológicas puras para comercializar PHAs, os custos de produção continuam consideravelmente altos para se tornar um produto competitivo (Adeline et al, 2003) e a sua comercialização está limitada

a aplicações de alto valor acrescentado (Crank e Patel 2005). Um obstáculo às aplicações dos PHAs é o seu preço, que é mais elevado que o dos polímeros sintéticos (Byron, 1987; Yamane, 1993). O preço é quase dez vezes superior ao dos polímeros sintéticos (van Wegen e tal, 1998).

Os custos elevados envolvidos na produção dos PHAs devem-se aos custos associados ao substrato (fonte de carbono puro), à operação do processo de fermentação (acidogénese) tipicamente sob condições estéreis, ao uso de culturas microbiológicas puras, frequentemente empregando organismos geneticamente modificados, e ao processamento a jusante.

Os biopolímeros e misturas de biopolímeros são usadas em várias industriais tais como a alimentar, farmacêutica, a de tintas e a de cuidados pessoais para conceder determinadas texturas, aparências e, até, propriedades tácteis e orais aos produtos (Norton, 2001).

O desenvolvimento de polímeros biodegradáveis é uma das principais preocupações da sociedade actual porque os polímeros convencionais tem muitos defeitos. Eles são produzidos a partir de recursos não renováveis como a petroquímica e não são compatíveis com o ciclo natural do carbono pelas suas características não biodegradáveis. Eles também estão a causar sérios problemas na paisagem natural e na vida selvagem devido à sua persistência no ambiente. Na redução destes problemas, o desenvolvimento de polímeros biodegradáveis tem-se tornado uma das potenciais contra-medidas (Adeline et al, 2003).

Na última década a investigação têm-se focado no desenvolvimento de processos de produção alternativos, com o objectivo de diminuir substancialmente os custos de produção de PHAs. Tais processos alternativos incluem não apenas o uso de engenharia genética, mas também o uso de substratos de baixo custo baseados em resíduos e produtos agro-industriais (Kim, 2000; Reddy e tal, 3003; Khanna and Srivastava, 2005; Lee e tal, 2008) e de culturas microbiológicas mistas (CMM), requerendo baixo custo de investimento e de operação devido ao uso de sistemas abertos que não requerem condições estéreis. Recentemente foi sugerido que o uso de culturas microbiológicas mistas pode ser mais favorável do que culturas puras, tanto em termos económicos como ambientais. (Gurieff and Lant, 2007)

Assim novas estratégias para diminuir os custos de produção de biopolímeros usando substratos económicos tais como efluentes orgânicos, como proposto neste projecto, podem tornar o processo global economicamente viável. No entanto, a implementação deste processo ainda requer pesquisas intensivas, nomeadamente na qualidade e estabilidade dos polímeros produzidos.

Apesar dos muitos esforços para melhorar os processos de produção de PHAs com culturas mistas, ainda têm de ser resolvidos alguns problemas, como a menor produtividade volumétrica (Albuquerque et al, 2011) e o menor teor de PHAs em relação a culturas puras.

Uma quantidade considerável de conhecimento tem sido acumulada na última década sobre a produção de PHAs com culturas microbianas mistas (CMM) (Dias e tal, 2006; Serafim et al, 2008). O uso de CMM para produzir produtos de valor acrescentado (como bioquímicos e biomateriais) usando princípios de selecção ecológicos para projectar a simbiose microbológica tem sido designada por ecobioteχνologia (Kleerebezem and van Loosdrecht, 2007).

A produção de biopolímeros envolve o desenvolvimento de um processo biológico em três passos usando culturas mistas de lamas activadas alimentadas com substratos que estão disponíveis em efluentes orgânicos industriais. Há dois passos cruciais no processo de produção de PHAs: a acidificação dos efluentes orgânicos e o enriquecimento de culturas microbianas. No primeiro passo, a quantidade relativa dos produtos de fermentação obtido vão condicionar o tipo de PHAs produzido (rendimento de extracção depende directamente do conteúdo de PHAs nas células) e na segunda etapa os esforços serão realizados para atingir as produtividades volumétricas dos processos de cultura pura (selecção de culturas com alta capacidade de armazenamento e de taxas de crescimento). Um dos factores limitantes do processo de produção de PHAs é o processo a jusante (extracção do polímero) que também contribui para os custos de produção.

Até agora várias metodologias foram testadas com sucesso para culturas microbológicas puras, mas a possibilidade de aplicar estes métodos a culturas mistas de estações de tratamento de águas residuais não foi até agora confirmada na literatura, devido às características particulares da biomassa.

Para além disso, também é importante determinar se a qualidade dos biopolímeros produzidos por CMM podem satisfazer as normas requeridas para o uso em aplicações comuns do plástico (que já foi demonstrada para os PHAs produzidos através da fermentação em culturas puras a partir de substratos refinados), especialmente considerando os polímeros produzidos a partir de matérias-primas baseadas em resíduos excedentários. Embora o número de estudos dedicados à produção de PHAs com cultura microbiana mista tenha aumentado consideravelmente nos últimos anos, apenas alguns dos estudos recentes investigaram as características dos polímeros (Serafim et al. 2008b; Bengtsson et al, 2010b; Patel et al, 2009).

Os PHAs tem recebido uma atenção crescente para substituir os plásticos petroquímicos convencionais, devido à escassez do petróleo (Madison et al, 1999; Rehm, 1999; Sudesh, 2000; Chen, 2001)

A produção de PHAs a partir de resíduos orgânicos, como os resíduos ricos em amido, podem reduzir significativamente o custo da sua produção por causa do baixo custo da matéria prima e da menor quantidade de lamas quando estão integradas num sistema de tratamento biológico (Yu, 2000).

1.3. PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

Este trabalho em particular foca um dos passos cruciais na produção de PHAs a partir de CMM: a acidificação de efluentes orgânicos. Os ácidos orgânicos voláteis produzidos durante a acidogénese podem ser utilizados e polimerizados em polihidroxialcanoatos (PHAs).

Uma das vantagens da produção em CMM diz respeito à maior variedade de tipos de PHAs obtidos. Em CMM, a composição do polímero depende da composição do efluente fermentado produzido no primeiro passos do processo de digestão anaeróbia. A produção de PHAs em CMM pode ser manipulada e controlada para produzir copolímeros com propriedades melhoradas (Takabatake et al., 2000; Lemos et al., 2006; Bengtsson et al., 2010b). Como demonstrado em Albuquerque et al. (2007), a manipulação das condições operacionais da fermentação anaeróbia usada para produzir AOVs pode também ser usada para controlar a composição do biopolímero no passo de produção de PHAs. No entanto, o grau de manipulação da composição dos polímeros ainda vai estar limitado pela gama de concentrações de AOVs obtidos por acidogénese de qualquer matéria-prima. Por isso, a fim de ampliar o leque de copolímeros produzidos a partir de qualquer efluente fermentado, com uma composição de AOVs estável, têm sido investigadas estratégias para manipular a composição dos polímeros em etapas de produção batch (Villano et al., 2010).

Apesar de culturas microbiológicas mistas demonstrarem um bom potencial para a produção de PHAs, atingindo altas produtividades específicas com rendimentos de polímeros e conteúdo máximo de PHAs similares aos conseguidos por culturas puras, estes sistemas ainda apresentam um comportamento inferior a culturas puras em termos de produção volumétrica. A maioria dos estudos de acumulação de PHAs em culturas mistas relatam concentrações de células inferiores a 10g/L de sólidos suspensos voláteis (Serafim et al., 2004; Dionisi et al., 2005, 2006; Bengtsson et al., 2008; Johnson et al., 2009; Beccari et al., 2009; Albuquerque et al., 2007, 2010a,b), enquanto que em fermentações de culturas pura são relatados frequentemente valores acima de 100g/L (Lee et al., 1999). O desenvolvimento de estratégias para melhorar a produtividade volumétrica é essencial para fazer este processo competitivo com as culturas puras. Recentemente, varios ácidos orgânicos voláteis (AOVs) produzidos a partir de efluentes orgânicos têm sido considerados uma fonte promissora para a produção de plásticos

biodegradáveis (Cohen et al, 1979). Por isso é muito desejada a produção selectiva de vários AOVs através do controlo de parametros operacionais.

A chave para a efectividade (em termos de armazenamento e produtividade) dos processos de produção de PHAs com CMM depende da selecção de culturas ricas em organismos que acumulam PHAs por condições impostas ao reactor (Albuquerque, 2010a).

Sendo assim, neste estudo foram testadas várias condições operatórias do processo de tratamento anaeróbio, utilizando águas residuais e resíduos orgânicos, com vista a encontrar as condições óptimas para produzir AOVs.

2. TRATAMENTO BIOLÓGICO ANAERÓBIO

Introduz-se aqui o processo de tratamento anaeróbio de efluentes, pois é esta a base de todo este trabalho. Este processo foi manipulado com o objectivo de criar sub produtos de valor a partir dos efluentes residuais orgânicos.

O tratamento anaeróbio de águas residuais é considerado uma tecnologia mais económica que o tratamento aeróbio para diferentes tipos de águas residuais incluindo efluentes domésticos e industriais. O sucesso do tratamento anaeróbio é atribuído à baixa produção de biomassa, ao elevado potencial de carga aplicado, ao menor consumo de nutrientes, a reactores mais pequenos e aos baixos custos de manutenção e operação (Kaushalya et al, 2011).

Para tratar efluentes industriais o tratamento anaeróbio tem demonstrado ser uma alternativa com um bom custo-benefício em relação ao tratamento aeróbio, com respeito à poupança de energia, de nutrientes e ao menor volume de reactor. A qualidade do efluente obtido não é tão boa como o obtido no tratamento aeróbio, pelo que o tratamento anaeróbio é normalmente utilizado como um pré-tratamento seguido de tratamento aeróbio (Tchobanoglous et al, 2003).

Um dos esquemas que na literatura procuram descrever as etapas do processo de degradação anaeróbia considera a existência de três etapas: hidrólise, produção de ácidos (acidogénese) e formação de metano (metanogénese) (Henze e Harremões, 1983).

2.1. HIDRÓLISE

A hidrólise é a primeira etapa para muitos processos de fermentação, em que os materiais particulados são convertidos em compostos solúveis que podem ser hidrolisados depois a simples monómeros que por sua vez podem ser utilizados e por bactérias que realizam a acidogénese. Para alguns efluentes industriais a acidogénese pode ser a primeira etapa no tratamento anaeróbio (Tchobanoglous et al, 2003).

2.2. ACIDOGÉNESE

A segunda etapa é a acidogénese. No processo de acidogénese os aminoácidos, açúcares e alguns ácidos gordos são degradados. Os substratos orgânicos servem como dadores e aceitadores de electrões. Os principais produtos da acidogénese são o acetato, hidrogénio, dióxido de carbono (CO_2), propionato e butirato. O propionato e o butirato são fermentados depois para produzirem também hidrogénio, CO_2 e acetato. Assim, os produtos finais da acidogénese (acetato, hidrogénio e CO_2) são os precursores da formação de metano na etapa seguinte, a metanogénese. (Tchobanoglous, 2003).

Os produtos solúveis oriundos da fase de hidrólise são metabolizados no interior das células das bactérias fermentativas, dando origem a diversos compostos mais simples, os quais são então excretados pelas células. Os compostos produzidos incluem ácidos orgânicos voláteis, álcoois, ácido láctico, dióxido de carbono, hidrogénio, amónia e sulfato de hidrogénio, além de novas células bacterianas. Como os ácidos orgânicos voláteis são o principal produto dos organismos fermentativos, estes são usualmente designados de bactérias fermentativas acidogénicas. A acidogénese é efectuada por um grande e diverso grupo de bactérias fermentativas, a exemplo das espécies *Clostridium* e *Bacteroids*. As primeiras constituem uma espécie anaeróbia que forma esporos, podendo dessa forma, sobreviver em ambientes totalmente adversos. As bactérias encontram-se geralmente presentes nos tratos digestivos, participando na degradação de açúcares e aminoácidos. A maioria das bactérias acidogénicas são anaeróbias estritas, mas cerca de 1% consiste de bactérias facultativas que podem oxidar o substrato orgânico por via oxidativa. Isso é particularmente importante, uma vez que as bactérias estritas podem ser assim protegidas contra a exposição ao oxigénio eventualmente presente no meio (Van Haandel & Lettinga et al. 1996 e Chernicharo).

2.3. METANOGÉNESE

A terceira etapa, a metanogénese, é realizada por um grupo de bactérias denominadas de metanogénicas. Dois grupos de organismos metanogénicos estão envolvidos na produção de metano. Um grupo produz metano a partir de acetato e o outro utiliza hidrogénio como dador de electrões e CO_2 como aceitador de electrões para produzir metano. Bactérias acetogénicas, em tratamento anaeróbio, também são capazes de usar O_2 para oxidar hidrogénio e formar ácido acético. No entanto, o ácido acético vai ser convertido em metano. Cerca de 72% do metano produzido em digestão anaeróbia é formado a partir de acetato (Tchobanoglous et al, 2003).

Esta é a etapa que se quer suprimir neste estudo, para manter os ácidos orgânicos voláteis disponíveis para outras aplicações. Os testes acidogénicos, Fases II e III, foram realizados na presença de um sal de sódio de nome ácido 2-Bromoethanesulfonic (1 mM/L) para inibir a metanogénese.

3. OBJECTIVOS

A sociedade actual enfrenta, entre outros, o problema da dependência e escassez do petróleo e o problema do controlo da poluição. Com este estudo, pretende-se contribuir para a resolução destes dois problemas em simultâneo.

Isto é possível utilizando resíduos orgânicos para produzir biopolímeros. Assim consegue-se reduzir a poluição causada por estes resíduos e possibilita a substituição de polímeros sintéticos, produzidos à base de petróleo, por biopolímeros que têm também a vantagem de serem biodegradáveis.

O intuito desta dissertação é estudar um passo a montante da produção de biopolímeros utilizando substratos complexos: a acidogénese anaeróbia. Durante a acidogénese produzem-se ácidos orgânicos voláteis (AOVs) que, entre outros fins, podem ser posteriormente polimerizados por bactérias.

O primeiro grande objectivo desta dissertação é maximizar a acidogénese em reactores *batch*, manipulando as condições operatórias do processo de digestão anaeróbia. Além da concentração de ácidos orgânicos totais, também é importante verificar se a proporção relativa de cada ácido é a adequada para a produção de biopolímeros.

Outro grande objectivo deste estudo é avaliar o potencial acidogénico de vários substratos (resíduos orgânicos), tanto em quantidade total de AOVs, como em qualidade para a produção de biopolímeros.

Há ainda um objectivo específico de estudar a inibição da metanogénese, antes de realizar os testes acidogénicos descontínuos, pois durante a metanogénese há consumo de AOVs.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizados vários ensaios em reactores *batch*, que são um método efectivo e eficiente para estudar a optimização da acidogénese (Coats et al. 2011). Este estudo realizou-se em três fases, com vários ensaios em cada fase.

4.1. MONTAGEM EXPERIMENTAL

A montagem experimental é bastante simples. Em todas as três fases deste estudo os reactores utilizados foram garrafas Oxitop® (WTW, Alemanha) de 320 mL, como os da Figura 1, aclimatizados numa estufa a 37°C.



Figura 1 - Garrafas Oxitop® IS 6 completo com sensores de pressão e placa de agitação

Foram utilizadas uma ou duas unidades Oxitop® IS 12 em simultâneo, consoante a necessidade. Os sensores de pressão foram utilizados apenas na primeira fase. Nas outras fases, por limitação de espaço, não foram utilizados os sensores de pressão (Figura 2), e os reactores foram fechados com película de parafilme.



Figura 2 - Garrafas Oxitop® com placa de agitação, sem sensores de pressão, em estufa

4.2. CONDIÇÕES OPERATÓRIAS

4.2.1. INÓCULO

Em todos os ensaios realizados foi adicionado inóculo. Foram utilizados como inóculo lamas provenientes de dois digestores anaeróbios distintos. Um foi recolhido numa ETAR municipal (Simria Sul), denominada aqui por “Simria”, e outra foi recolhida numa ETAR doméstica em Salgueiro, denominada neste trabalho por “Salgueiro”. Há também distinção entre “Simria” I, II e III porque apesar de serem inóculos com a mesma origem apresentaram características diferentes.

4.2.2. TEMPERATURA

Os reactores foram aclimatizados numa estufa a 37°C. Têm sido referidas duas temperaturas óptimas para tratamento anaeróbio, uma no intervalo mesófilo de 29 °C a 38 °C e a outra no intervalo termófilo de 49 °C a 57 °C. A velocidade de degradação anaeróbia aumenta com a temperatura até cerca de 35 °C a 38° C. A partir destes valores a velocidade não aumenta significativamente e de facto pode diminuir até a temperatura termofílica ser atingida (McCarty 1964). Apesar do tratamento proceder muito mais rápido no intervalo termófilo, o calor adicional requerido pode anular a vantagem obtida. Assim a maioria dos sistemas são projectados para operar na fase mesófila (McCarty, 1964). O presente estudo também foi operado na fase mesófila, à temperatura de 37 ° Celsius, em todos os ensaios.

4.2.1. AGITAÇÃO

Todos os ensaios foram continuamente agitados. A agitação efectuou-se por meio de agitadores magnéticos. A placa de agitação é parte integrante do conjunto Oxitop®, como se pode verificar na Figura 1.

4.2.2. ALCALINIDADE

O bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foi o reagente utilizado para manipular a alcalinidade. Este reagente tem vantagens significativas em relação a outros. É relativamente barato, não reage com o dióxido de carbono criando vácuo no digestor, há baixo risco de aumentar o pH para níveis indesejáveis, e é bastante solúvel. O bicarbonato de sódio pode ser adicionado para dar alcalinidade no digestor até 6 g/L sem produzir nenhum efeito tóxico ou adverso. O fácil controlo, adição e manuseamento faz deste um reagente desejável para controlar o pH num digestor. No presente estudo a existência de alcalinidade no digestor é um factor importante pelo seu efeito tampão de modo a que um grande aumento de ácidos orgânicos voláteis possa ocorrer com uma queda mínima de pH (McCarty 1964).

4.2.3. NUTRIENTES

Macro e micro nutrientes foram adicionados em todos os ensaios conforme recomendado em Capela et al, 1999. A composição destes nutrientes pode ser consultada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição e concentração das soluções de nutrientes adicionadas

Soluções de nutrientes para processos anaeróbios (1mL cada solução / L alimentação)	
Solução de micro nutrientes:	
FeCl ₃ .6H ₂ O	2454 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	2000 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	500 mg/L
CuCl ₂ .4H ₂ O	30 mg/L
ZnCl ₂	50 mg/L
H ₃ BO ₃	50 mg/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	90 mg/L
EDTA	1000 mg/L
NiCl ₂ .6H ₂ O	50 mg/L
Solução de macro nutrientes 1:	
NH ₄ Cl	170 mg/L
KH ₂ PO ₄	37 mg/L
Solução de macro nutrientes 2:	
CaCl ₂ .2H ₂ O	8 mg/L
MgSO ₄ .4H ₂ O	9 mg/L

4.3. SUBSTRATOS UTILIZADOS

Conforme definido nos objectivos deste trabalho, todos os substratos utilizados são resíduos orgânicos. São eles o soro de leite, o glicerol, o efluente vínico, a fracção orgânica de resíduos sólidos urbanos (FORSU) e o efluente de lagares de azeite. Estes substratos são descritos de seguida de forma breve.

4.3.1. SORO DE LEITE

O soro de leite é um residuo agroindustrial com baixo valor comercial, que resulta da produção de queijos. É um resíduo/subproduto abundante em Portugal e uma fracção considerável não é valorizada pelo que o torna adequado para estudos alternativos de

valorização. O soro empregado nestas experiências foi recolhido numa empresa líder do mercado de queijo em Portugal.

4.3.2. GLICEROL

O glicerol resultante da produção de biodiesel é um subproduto impuro e barato (Siles 2010; Lopez et al, 2009). O glicerol também pode ser um subproduto da indústria do sabão ou da produção de propeno. Mas o excesso causado pela recente produção industrial de biodiesel tornou-o barato e o seu grau de pureza não lhe permite muitas das suas habituais utilizações. Se for purificado tem mais de 2000 utilizações (Elvers et al., 1990). No entanto, a oferta deste suproduto excede a procura comercial de glicerol puro (Lopez et al, 2009). Há assim todo o interesse em encontrar novas formas de utilizar e valorizar este subproduto.

4.3.3. EFLUENTE VÍNICO

Os efluentes vínicos englobam, de uma forma geral todos os líquidos resultantes de lavagens de adegas. São constituídos principalmente por águas, açúcares, álcool, ácidos orgânicos e polifenóis, e em menor grau por detergentes e desinfectantes (Badie, 1998; Desenne e tal, 2003). Nesta experiência foi utilizada uma simulação de efluente vínico com diluição de vinho.

A CQO dos efluentes vinícolas pode variar entre 0,8 e 98 gCQO/L (Vieira, 2009), de acordo com a fase e método de produção. No entanto são os valores mais baixos, na ordem de 10 gCQO/L ou inferiores, os mais referidos. Nesta experiência foi simulado um efluente vínico por diluição de vinho obtendo-se uma solução com 26 gCQO/L. Este valor é excessivo segundo a maioria as referências encontradas e justifica-se pela necessidade de se conseguir realizar a experiências em volumes reaccionais de 200mL.

4.3.4. FRACÇÃO ORGÂNICA DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS

A regulamentação europeia tem vindo a limitar a deposição em aterro de resíduos orgânicos. Neste sentido é necessária a utilização de novas formas de tratamento ou, se possível, a valorização destes resíduos. Por este motivo a fracção orgânica de resíduos sólidos urbanos (FORSU) também foi um substrato testado para produzir AOVs.

Dada a dificuldade em obter uma amostra representativa, foi utilizada uma FORSU simulada neste estudo. Esta simulação basea-se nas características médias de resíduos provenientes de restaurantes (Flor 2006). A composição exacta do FORSU simulado encontra-se descrita na Figura 3.

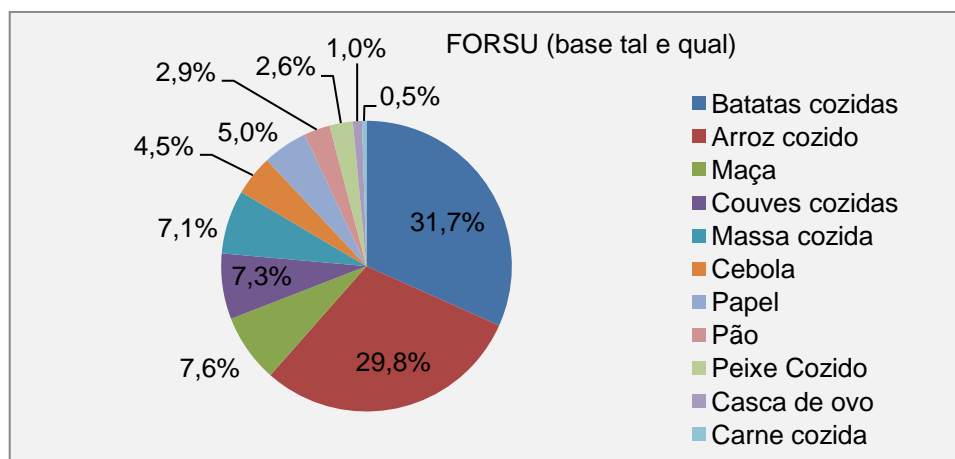


Figura 3 - Composição da FORSU simulada em base tal e qual

Os componentes que constituem a FORSU foram previamente cozidos, cortados em pedaços pequenos, triturados com varinha mágica (Braun 600W) e homogeneizados por transferência entre recipientes. A amostra foi conservada a 4°C.

4.3.5. *EFLUENTE DE LAGARES DE AZEITE*

O tratamento de efluente de fábricas de azeite, mesmo quando realizado com a tecnologia mais apropriada, digestão anaeróbia, encontra grandes dificuldades em atingir as eficiências de depuração requeridas pelas regulações nacionais em toda a área mediterrânea. Nos países de olivicultura do mediterrâneo (Grécia, Itália, Líbano, Portugal, Espanha, Síria, Tunísia, Turquia), a produção de efluentes de fábricas de azeite é superior a 30 milhões m³/ano. As dificuldades de tratamento deste resíduo estão principalmente relacionadas com a elevada carga orgânica, apresentando CQO até 200g/L e com a presença de componentes orgânicos que são difíceis de degradar pelos microrganismos (cadeias longas de ácidos gordos e compostos fenolíticos da família propanóica C-7 e C-8 (Becari, 1996).

4.3.6. *CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS*

Foram analisadas algumas características dos substratos utilizados (glicerol, soro de leite, efluente vínico, FORSU e efluente de lagares de azeite). Os resultados da caracterização dos substratos utilizados encontram-se resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização dos substratos utilizados

Substrato	CQO [g/L]	CQO [g/Kg]	%SST	pH
Glicerol	---	2030	57,2	9,21
Soro de Leite	31,78	---	---	6,35
Efluente Vínico	26,92	---	---	3,25
FORSU	---	380	27,1	---
Efluente de Lagares de Azeite	55,70	---	---	5,26

4.4. PARÂMETROS ANALISADOS

4.4.1. CARÊNCIA QUÍMICA DE OXIGÉNIO (CQO)

Para determinação da carência química de oxigénio (CQO) foram utilizados dois métodos: o método de Refluxo Fechado – Método Colorimétrico, para analisar os substratos líquidos, e o método de Refluxo Aberto para analisar substratos sólidos ou viscosos. Ambos os métodos seguiram as directrizes do Standard Methods (APHA, 1999).

A CQO analisada pelo método de Refluxo Fechado refere-se sempre à CQO solúvel. As amostras foram previamente filtradas utilizando filtros Reeve Angel®, grade 403, de 4,7 cm. Com este método, a digestão foi realizada num digestor Aqualitic AL38, durante 2 (duas) horas a 150°C. Após digestão e arrefecimento das amostras, a CQO destas foi determinada utilizando o espectrofotómetro Aqualytic COD vario PC Compact. Este espectrofotómetro converte a absorvância e exprime o resultado em mgCQO/L.

No caso do método de Refluxo Aberto, as amostras foram digeridas em balão de fundo redondo (com condensador de refluxo acoplado) numa manta de aquecimento com potência de, no mínimo, 1,4 W/cm² e igualmente durante duas horas. Depois as amostras são diluídas a 50% com água destilada e arrefecidas. Em seguida realiza-se uma titulação do dicromato em excesso com uma solução de Sulfato Ferroso Amoniacal (FAS) de concentração conhecida. Por fim, a CQO é calculada a partir da diferença entre o volume de FAS utilizado para titular a amostra e o volume de FAS utilizado para titular um branco.

Estas análises foram realizadas em triplicado e os valores anunciados correspondem aos valores médios.

4.4.2. BIOGÁS

A composição do biogás foi determinada por cromatografia gasosa num cromatógrafo gasoso SRI 8610C. Este equipamento revelou valores relativamente à percentagem (v/v) de metano (CH_4), de dióxido de carbono (CO_2) e de outros componentes gasosos (N_2 , H_2 , H_2S , etc.).

4.4.3. PH

Este parâmetro foi medido com o titulador Mitsubishi GT-06 Automatic Titrator. O aparelho foi previamente calibrado com soluções tampão (comerciais) de pH conhecido.

4.4.4. ÁCIDOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

Os Ácidos Orgânicos Voláteis (AOVs), nomeadamente o Ácido Acético, o Ácido Propiónico, o Ácido I-butírico, o Ácido N-butírico, o Ácido I-valérico, o ácido N-valérico e o Ácido N-capróico, foram determinados por cromatografia gás-líquido, através de um cromatógrafo Chrompack CP 9001.

As amostras para análise de AOVs foram previamente filtradas (utilizando filtros Reeve Angel®, grade 403, de 4,7 cm) ou centrifugadas numa centrífugadora Hettich Universal II, para separar a fase solúvel. Foi então recolhido em tubo de polietileno 5 mL de amostra solúvel, à qual foram adicionados 0,5 mL de ácido fórmico e conservada no frio (4°C) até posterior análise no cromatógrafo.

Com os cromatogramas obtidos, como o que se apresenta na Figura 4, é possível quantificar cada um dos ácidos já referidos.

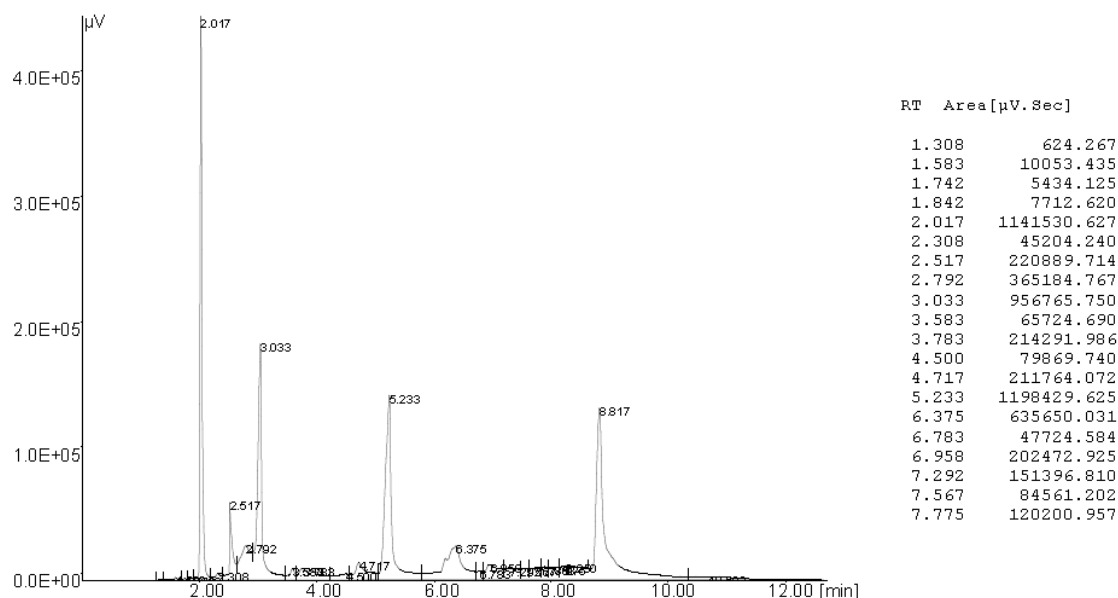


Figura 4 – Exemplo de um cromatograma resultante de uma análise de amostra de AOVs

Após calibração do aparelho com padrões mistos de concentração conhecida, é estabelecida uma relação entre a área de cada pico do cromatograma e a concentração de AOVs correspondente, possibilitando desta forma a identificação e quantificação de cada AOV nas amostras analisadas.

4.4.5. SÓLIDOS

A quantificação de Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), Sólidos Totais (ST) e Sólidos Voláteis Totais (SVT) foi realizada segundo o Standard Methods (APHA, 1999).

Os SST foram determinados por filtração de um volume conhecido (geralmente 5mL) de amostra (utilizando filtros Reeve Angel®, grade 403, de 4,7 cm) e posterior secagem da fracção sólida retida no filtro em estufa (Shimadan) a 105°C, durante 24h. O peso destes sólidos após estufa indica a quantidade de SST.

Para determinar os SSV, os filtros anteriores são calcinados em mufla (Termolab SR-24) a 550°C, durante 2 (duas) horas. A variação da massa sólida após a mufla indica a quantidade de SSV.

Para determinar os ST e os SVT em substratos sólidos ou mais viscosos, o procedimento é essencialmente o mesmo com a diferença que não há filtração de volume conhecido e em seu lugar é inicialmente pesada uma massa conhecida (cerca de 1 g) de amostra. O restante procedimento é igual ao dos SST e SSV.

Os sólidos suspensos voláteis correspondem à biomassa (matéria orgânica) em suspensão contida na amostra em substratos solúveis, enquanto os sólidos suspensos totais representam a matéria orgânica e inorgânica em suspensão na amostra.

Estas análises foram realizadas em triplicado e os valores anunciados correspondem aos valores médios.

4.5. CONDIÇÕES DE ARRANQUE E MONITORIZAÇÃO DOS ENSAIOS

4.5.1. INIBIÇÃO DA METANOGENÉSE – FASE I

Nesta fase, pretende-se inibir a ultima etapa do processo de degradação anaeróbia, a metanogénese, de forma a reduzir o consumo dps AOVs produzidos nos testes acidogénicos. O ácido 2-Bromoethanesulfonic (BES) é um bom inibidor da metanogénese (Bouwer & McCarty, 1983) e foi o inibidor escolhido. O objectivo desta fase é a

determinação da concentração de BES mais adequada para impedir a metanogénese em digestão anaeróbia para duas situações onde foram utilizados inóculos de origens distintas e apresentados anteriormente: “Simria” e “Salgueiro”.

Assim, foram realizados 6 (seis) ensaios para cada inóculo, num total de 12 (doze) ensaios, com diferentes concentrações de BES abarcando uma vasta gama, desde 0 mM BES/L a 50 mM BES/L (Figura 4).

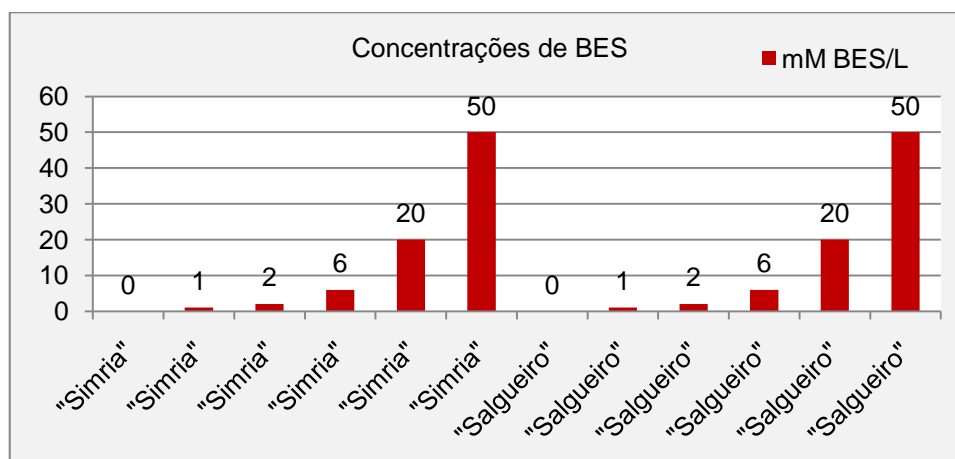


Figura 5 - Concentrações de BES testadas - Fase I

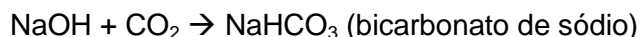
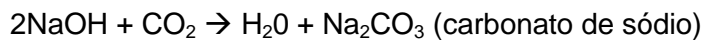
Cada reactor foi inóculado com 2 gSSV/L do respectivo inóculo. Foram adicionados macro e micro nutrientes com as características e nas concentrações indicadas na Tabela 1. Por fim adicionou-se água destilada até perfazer o volume reaccional de 150 mL. A experiência decorreu durante 30 dias, à temperatura de 37°C e com agitação. No Anexo, Tabela A2, pode ser verificada a composição inicial detalhada de cada ensaio desta primeira fase.

4.5.1.1. MONITORIZAÇÃO NA FASE I

Durante a etapa metanogénica, são consumidos ácidos orgânicos voláteis (AOVs) que são os intermediários que se pretendem obter na fase acidogénica, daí a necessidade de começar por garantir que esta etapa não ocorre antes de investigar as condições para maximizar a acidogénese.

Nesta fase as garrafas Oxitop®, onde decorreram os ensaios, estavam equipadas com sensores de pressão, que registaram a pressão durante os 30 dias da experiência. Um aumento de pressão no interior do reactor corresponde a um aumento de gás produzido. Os gases produzidos pelos microrganismos na ausência de oxigénio são maioritariamente dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄). Foi utilizado, no interior de cada reactor e em contacto apenas com o biogás, NaOH para absorver o CO₂ produzido

pela actividade microbiana, formando carbonato ou bicarbonato de sódio, e apenas deixando o metano.



Deste modo pressupõe-se que a variação de pressão se deve praticamente à produção de metano no reactor. Este pressuposto deveria ter sido confirmado pela análise ao biogás, que não foi possível devido à inoperacionalidade do cromatógrafo de gás durante esta fase. A variação de pressão pode ser convertida em volume de biogás (metano) produzido pela lei dos gases ideais.

Lei dos Gases Ideais:

$$p.V = n.R.T \leftrightarrow V = \frac{n.R.T}{p}$$

em que

p = pressão em Pascal (N/m²)

V = volume de gás (m³)

n = numero de moles de gás formado (mol)

T = temperatura de incubação (K)

Assim, quanto menor a pressão existente no interior do reactor, menor o volume de biogás produzido e, sendo o biogás essencialmente metano, menor a quantidade de metano produzida. As concentrações de BES utilizadas são uma primeira aproximação, podendo ser necessário repetir o procedimento com outras concentrações.

No final desta fase foi medido o pH e foram analisados os Sólidos Suspensos Totais (SST) e os Sólidos Suspensos Voláteis (SSV). O pH e os Sólidos foram medidos apenas no final para não interferir com a pressão dos reactores.

4.5.2. OPTIMIZAÇÃO DA ACIDOGÉNESE – FASE II

A Fase II tem como objectivo a optimização da produção de ácidos orgânicos voláteis no que diz respeito à razão F/M e alcalinidade. Foram utilizados o inóculo e concentração de BES seleccionados de acordo com os resultados da fase anterior, Fase I. Ou seja, utilizou-se o inóculo “Simria” II e 1 mM BES/L. A fase II foi realizada utilizando apenas como substrato o soro de leite.

As variáveis em estudo foram a alcalinidade e a razão alimento/microrganismos (F/M). A alcalinidade inicial adicionada variou entre 0 e 6 g HCO₃⁻/L (Figura 6). Digestores anaeróbios a funcionar correctamente têm tipicamente alcalinidades na faixa de 2-4 g

CaCO_3 / L (APHA, 1999). Para alcalinizar o meio utilizou-se Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3).

E a razão alimento/ microrganismos (F/M) variou entre 1 e 4 (Figura 6). Por outras palavras, sendo a concentração de microrganismos sido mantida constante no valor de 2 gSSV/L, a qualidade de matéria orgânica na alimentação variou entre 2 gCQO/L e 8 gCQO/L.

As particularidades de cada ensaio, num total de 16 (dezasseis) estão apresentadas na Figura 6. Foram efectuados 4 ensaios para cada valor de F/M onde foi variada a alcalinidade.

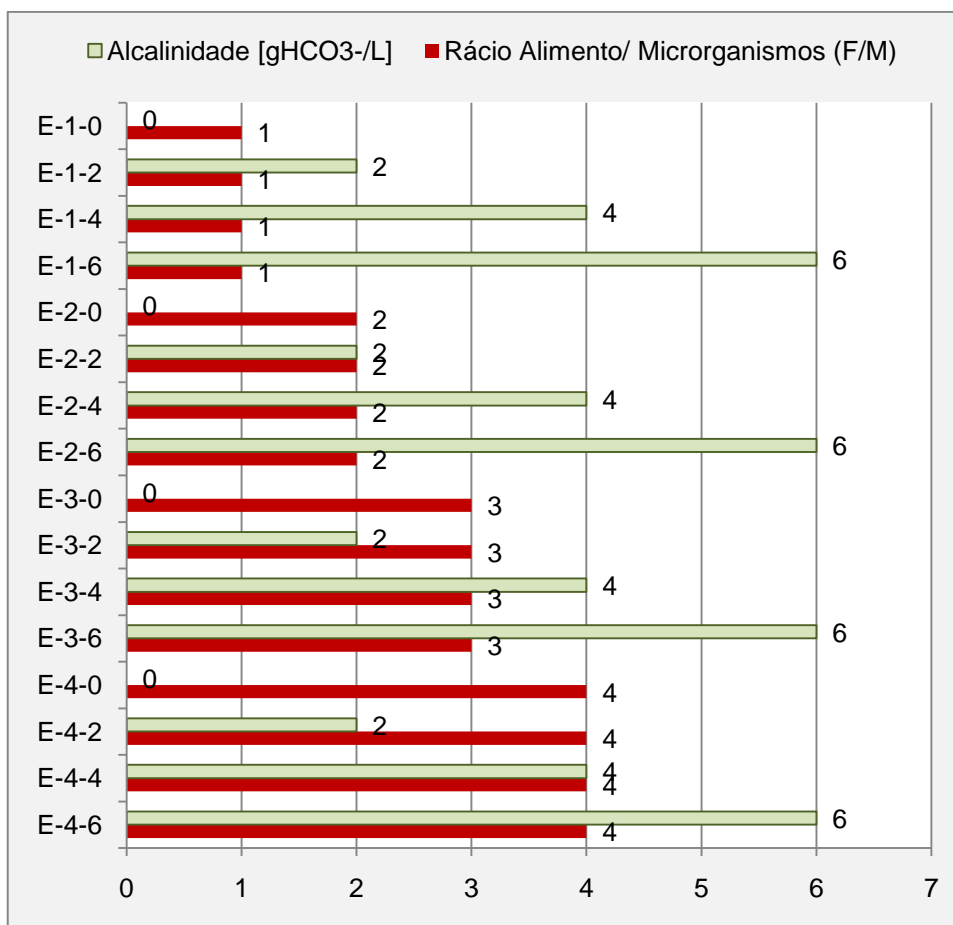


Figura 6 - Rácio F/M e Alcalinidade de cada ensaio – Fase II

Foram também adicionados macro e micro nutrientes, com as características e nas concentrações indicadas na Tabela 1, e água destilada até perfazer o volume reaccional. Estes ensaios operaram com um volume reaccional de 200mL e sem sensores de pressão. Os reactores operaram durante 30 dias, aclimatizados a 37°C e com agitação. A composição detalhada de cada ensaio pode ser consultada em Anexo, Tabela A.6.

4.5.2.1. MONITORIZAÇÃO NA FASE II

Na Fase II foram analisados semanalmente o biogás, o pH e preparada uma amostra para análise dos AOVs.

Foram usadas garrafas Oxitop® equipadas com tampas de rosca com o centro de borracha que permitem a inserção da agulha de uma seringa para a recolha do biogás e posterior análise deste no cromatógrafo de gás.

No final foram analisados os Sólidos Suspensos Totais (SST) e os Sólidos Suspensos Voláteis (SSV).

4.5.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ACIDOGÉNICO DE VÁRIOS SUBSTRATOS – FASE III

Na Fase III foi estudada a produção de ácidos orgânicos voláteis utilizando diferentes substratos. Foi testado o potencial acidogénico dos seguintes substratos: soro de leite, glicerol, efluente vínico, fracção orgânica de resíduos sólidos urbanos (FORSU) e efluente de lagares de azeite.

As condições operatórias adoptadas nesta fase foram as que causaram os três melhores resultados na fase anterior - Fase II - em termos de concentração máxima de AOVs total que são: F/M=4 e Alk=4 gHCO₃⁻/L, F/M=4 e Alk=2 gHCO₃⁻/L, e F=3 e Alk=6 gHCO₃⁻/L (Tabela 3). Todos os outros factores são iguais em todos os reactores. A alcalinidade foi manipulada com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e naturalmente, também foi adicionado 1 mM BES/L para inibir a metanogénese.

Tabela 3 - Características particulares de cada ensaio - Fase III

Ensaio	Substrato	Razão Alimento/ Microrganismos (F/M)	Alcalinidade [gHCO ₃ ⁻ /L]
G-4-4	Glicerol	4	4
G-4-2	Glicerol	4	2
G-3-6	Glicerol	3	6
S-4-4	Soro de leite	4	4
S-4-2	Soro de leite	4	2
S-3-6	Soro de leite	3	6
V-4-4	Efluente vínico	4	4
V-4-2	Efluente vínico	4	2
V-3-6	Efluente vínico	3	6

F-4-4	FORSU	4	4
F-4-2	FORSU	4	2
F-3-6	FORSU	3	6
L-4-4	Efluente de lagares de azeite	4	4
L-4-2	Efluente de lagares de azeite	4	2
B-0-4	Sem substrato (branco)	0	4
B-0-2	Sem substrato (branco)	0	2
B-0-6	Sem substrato (branco)	0	6

Foram também adicionados macro e micro nutrientes, com as características e nas concentrações indicadas na Tabela 1, e água destilada até perfazer o volume reaccional. Estes ensaios operaram com um volume reaccional de 200mL e sem sensores de pressão. A composição detalhada de cada ensaio encontra-se descrita no Anexo, tabela A.17.

Os ensaios da Fase III foram preparados e operados da mesma forma que os da fase anterior. Os ensaios decorreram durante 30 dias climatizados a 37°C, com agitação.

4.5.3.1. MONITORIZAÇÃO NA FASE III

A monitorização destes ensaios é em tudo igual à anterior. Na Fase III foram analisados semanalmente o biogás, o pH e preparada uma amostra para análise dos AOVs.

No final também foram analisados os Sólidos Suspensos Totais (SST) e os Sólidos Suspensos Voláteis (SSV).

4.5.4. QUADRO COMPARATIVO DAS TRÊS FASES

Para clarificar as condições de operação das três fases e análises efectuadas apresentam-se na Tabela 4 as principais características de cada fase, de modo a se poderem identificar as diferenças.

Tabela 4 - Quadro comparativo das três fases

	Fase I	Fase II	Fase III
Inóculo [gSSV/L]	2	2	2
Temperatura [°C]	37	37	37
Sensor de Pressão	Sim	Não	Não

Volume Reaccional [mL]	150	200	200
Volume Reactor [mL]	320	320	320
Substrato	Não	Sim (Soro de leite)	Sim (Vários)
Micro e Macro Nutrientes	Sim	Sim	Sim
Agitação	Sim	Sim	Sim
Análises Semanais	---	pH, Biogás, AOVs	pH, Biogás, AOVs
Análises Finais	SST, SSV	SST, SSV	SST, SSV

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os resultados são apresentados fase a fase. Primeiro a inibição da metanogénese – Fase I. Depois a optimização da acidogénese – Fase II. Por fim, o potencial acidogénico de vários substratos – Fase III.

5.1. INIBIÇÃO DA METANOGENÉSE - FASE I

A inibição da metanogénese foi testada em ensaios com 2 (dois) inóculos diferentes (“Salgueiro” e “Simria”) e os resultados são apresentados separadamente. Os parâmetros analisados foram os Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), o pH e a pressão interna dos reactores que foi monitorizada continuamente.

5.1.1. INIBIÇÃO DA METANOGENÉSE COM INÓCULO “SALGUEIRO”

Os primeiros resultados apresentados correspondem ao Inóculo “Salgueiro”. Mediu-se o pH nos reactores no final dos ensaios e verificou-se que este variou entre 8,88 e 7,65, correspondendo o pH mais baixo ao ensaio com 50 mM BES/L.

Na Figura 7 são apresentados os valores correspondentes aos Sólidos dos ensaios, quer voláteis totais quer voláteis no final dos ensaios, assim como a percentagem de sólidos voláteis.

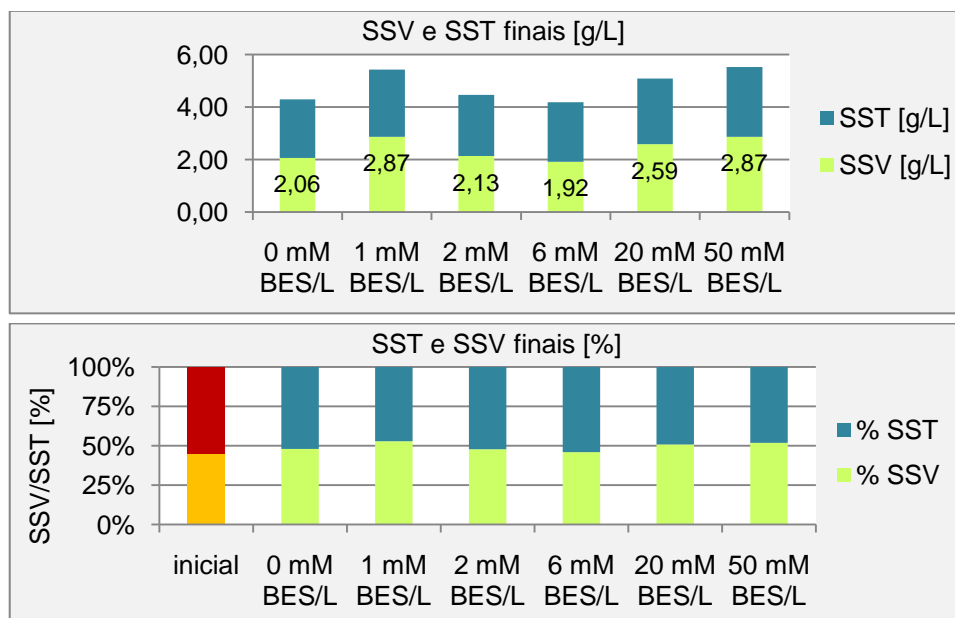


Figura 7 – SST e SSV finais nos ensaios com o inóculo “Salgueiro” – Fase I

Assim nota-se que a razão SST/SSV se mantém entre 46% e 53%, semelhante à razão inicial de (45%).

A pressão nos reactores encontra-se na Figura 8 já convertida em volume de biogás (metano). Graficamente estão apenas representados os primeiros 15 dias da experiência (de 30 dias no total). As alterações importantes acontecem nos primeiros dias e nos últimos 15 dias não se verificaram alterações relevantes.

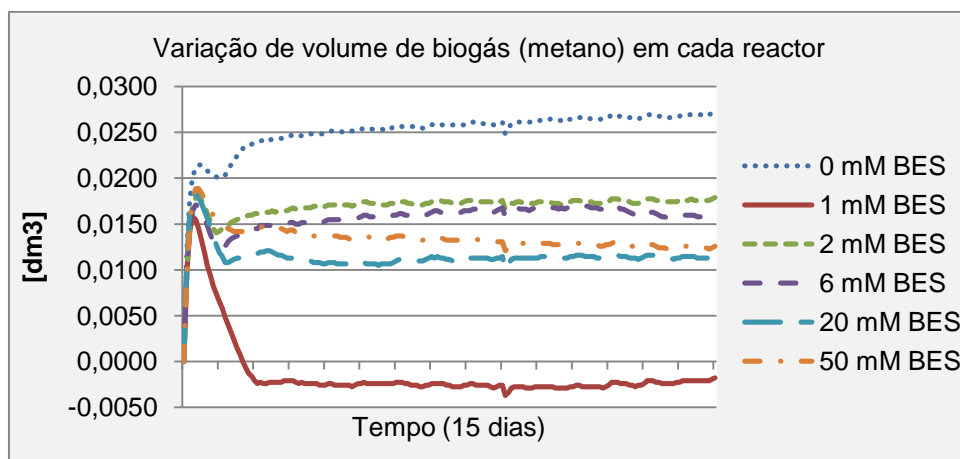


Figura 8 - Variação de volume de biogás nos ensaios com o inóculo “Salgueiro” – Fase I

Verifica-se claramente que 1 mM BES/L é a concentração que melhor inibe a metanogénese. A partir do segundo dia este reactor com 1 mM BES/L encontra-se até em ligeira depressão, presumivelmente devido ao consumo do oxigénio, inicialmente existente, por bactérias que o converteram em dióxido de carbono. Este CO₂ produzido é absorvido pelo NaOH, deixando o sistema ligeiramente em depressão. O pico inicial no volume no primeiro dia, mesmo no reactor com 1 mM BES/L deve-se, muito provavelmente, à quantidade de CO₂ produzido ser superior ao absorvido momentaneamente. No entanto, no final do segundo dia o CO₂ estava completamente absorvido pelo NaOH.

Verifica-se também que a situação em que não se adicionou nenhum BES é menos adequada. As restantes situações têm um comportamento muito semelhante apesar das suas concentrações variarem consideravelmente, entre 2mM BES/L e 50mM BES/L. É de realçar que a extensão da inibição da metanogénese não tem nenhuma relação directa com a concentração de BES.

5.1.1. INIBIÇÃO DA METANOGENESE COM INÓCULO “SIMRIA”

Quanto ao pH final nos ensaios com o inóculo “Simria”, verificou-se que este variou entre 11,9 e 7,45, correspondendo o pH mais baixo ao ensaio com 50 mM BES/L.

Na Figura 9 são apresentados os valores correspondentes aos SST e SSV no final dos ensaios, assim como a razão SSV/SST.

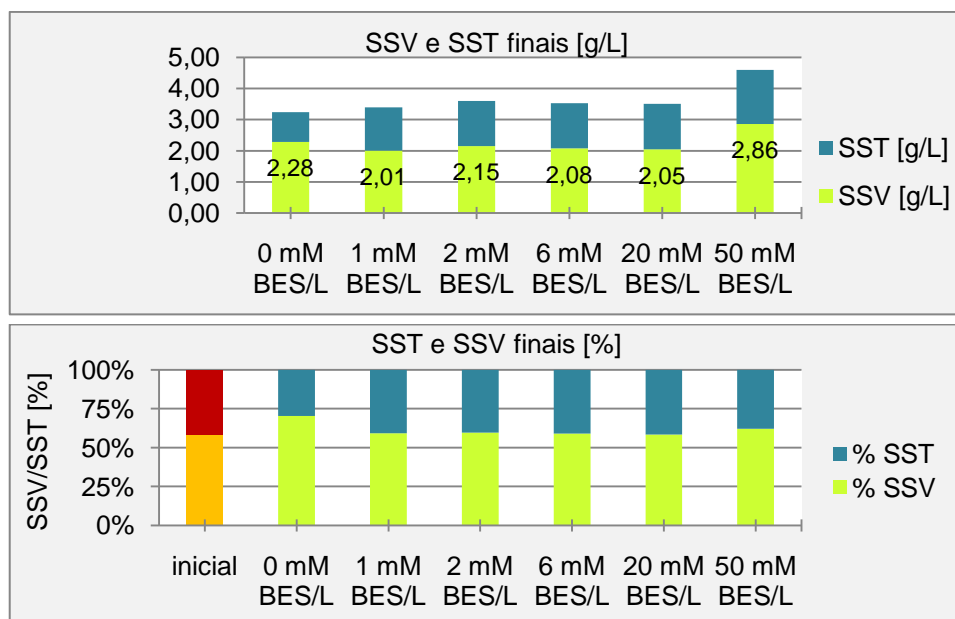


Figura 9 – SST e SSV finais nos ensaios com o inóculo “Simria” – Fase I

Verifica-se que neste caso os valores da razão SST/SSV são bastante semelhantes (entre 58% e 62%), à excepção do ensaio com 0 mM BES/L (70%).

Como se pode verificar pela Figura 10, com o inóculo “Simria” a metanogénese é também inibida com 1 mM BES/L.

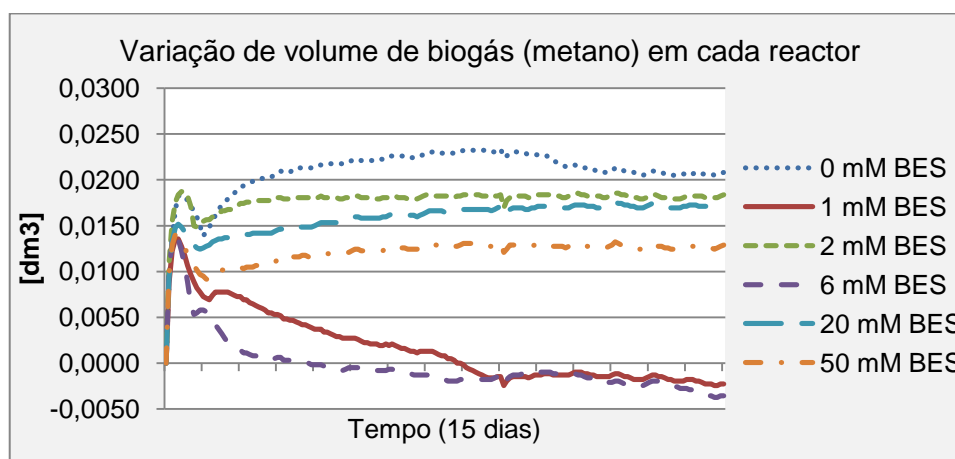


Figura 10 - Variação de volume de biogás nos ensaios com o inóculo “Simria” – Fase I

De realçar que com este inóculo houve também inibição da metanogénese no ensaio com 6 mM BES/L. Mas em qualquer destas duas situações, demorou mais tempo a retoma ao volume/pressão inicial. Ou, por outras palavras, prolongou-se por mais tempo a absorção do CO₂, provavelmente devido a maior produção deste gás ao longo dos primeiros dias.

5.1.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A concentração de 1 mM BES/L mostrou-se eficiente a inibir a metanogénese independentemente do inóculo utilizado. Ambos os inóculos poderiam ter sido utilizados nesta Fase II, mas por uma questão de homogeneidade, aspecto visual e disponibilidade optou-se por utilizar o inóculo “Simria” nas fases seguintes. Neste caso pode-se-ia ter utilizado ter utilizado 6 mM BES/L, mas as quantidades de BES a adicionar nos ensaios futuros não justificariam a diferença de comportamento entre 1 e 6 mM BES/L.

5.2. OPTIMIZAÇÃO DA ACIDOGÉNESE PARA O SORO DE LEITE - FASE II

Nesta segunda fase utilizou-se 1 mM BES/L em todos os ensaios e o inóculo “Simria”.

Os resultados são apresentados e analisados de forma independente de acordo com o seu rácio alimento/microrganismos (F/M). Para cada rácio F/M realizaram-se 4 (quatro) ensaios com alcalinidades de 0 gHCO₃⁻/L, 2 gHCO₃⁻/L, 4 gHCO₃⁻/L e 6 gHCO₃⁻/L, respectivamente.

Os ensaios estão identificados da forma E-x-y em que x é o valor do rácio F/M e y é o valor da alcalinidade em gHCO₃⁻/L.

5.2.1. RESULTADOS DOS ENSAIOS COM RÁCIO F/M=1

Os primeiros resultados apresentados são relativos ao pH (Figura 11). O pH em todos os reactores é muito semelhante ao longo das 4 (quatro) semanas, excepto para o ensaio E-1-0, sem alcalinidade adicionada, que apresenta um comportamento mais particular, verifica-se que a adição de alcalinidade confere estabilidade ao pH nos ensaios. Estes valores de pH com uma ligeira tendência de subida e com valores a ultrapassar o pH 8 (oito) indicam uma baixa produção de ácidos orgânicos voláteis e ou cosumo dos mesmos.

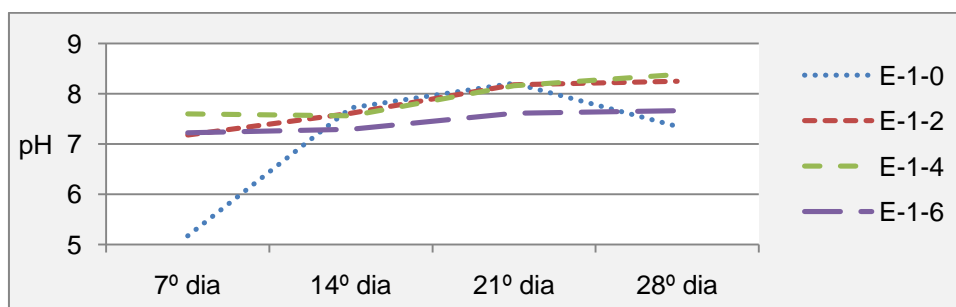


Figura 11 - pH nos ensaios com rácio F/M= 1 – Fase II

Nenhum dos ensaios com rácio F/M=1 conseguiu manter a biomassa inicial de cerca de 2 gSSV/L. Estes resultados indicam que este rácio é pouco favorável à actividade microbiana, independentemente da alcalinidade adicionada.

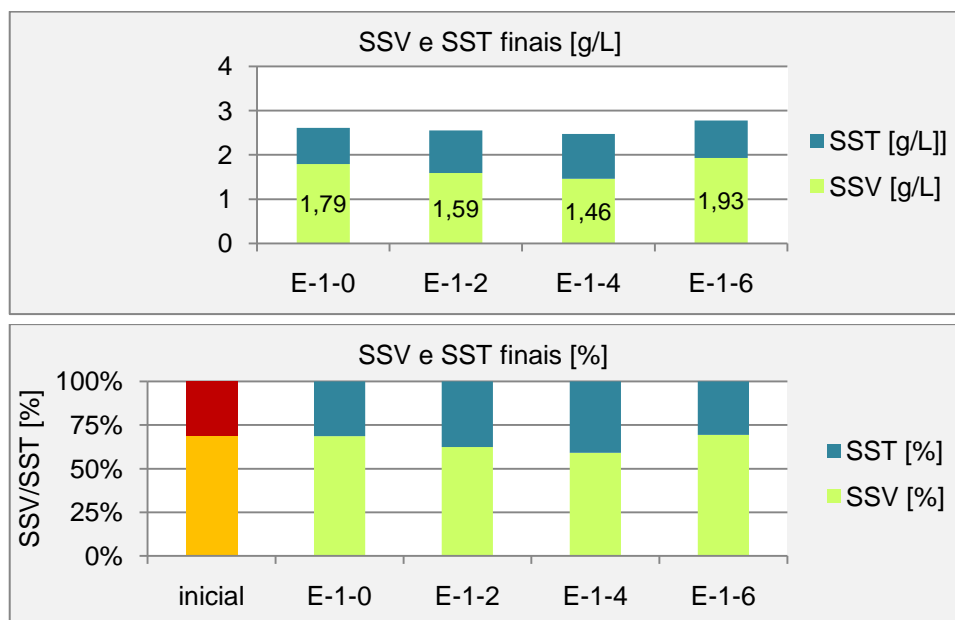
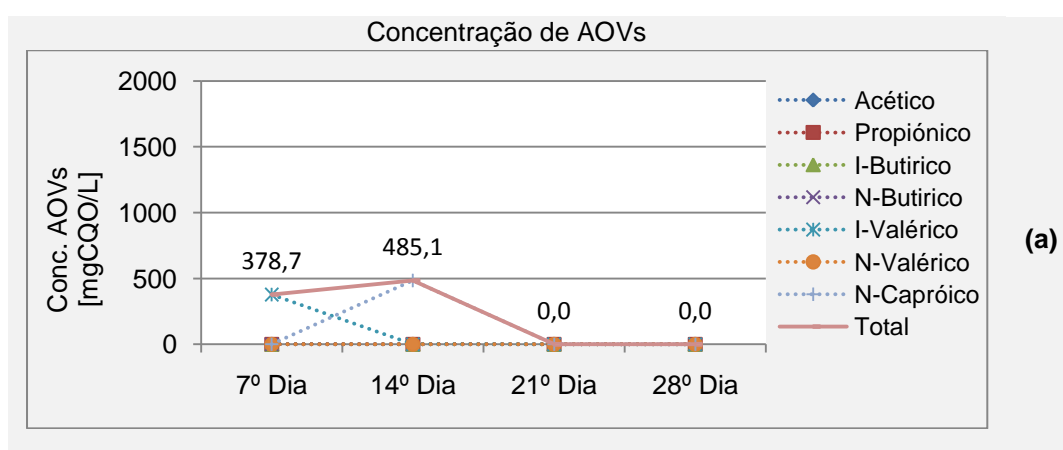
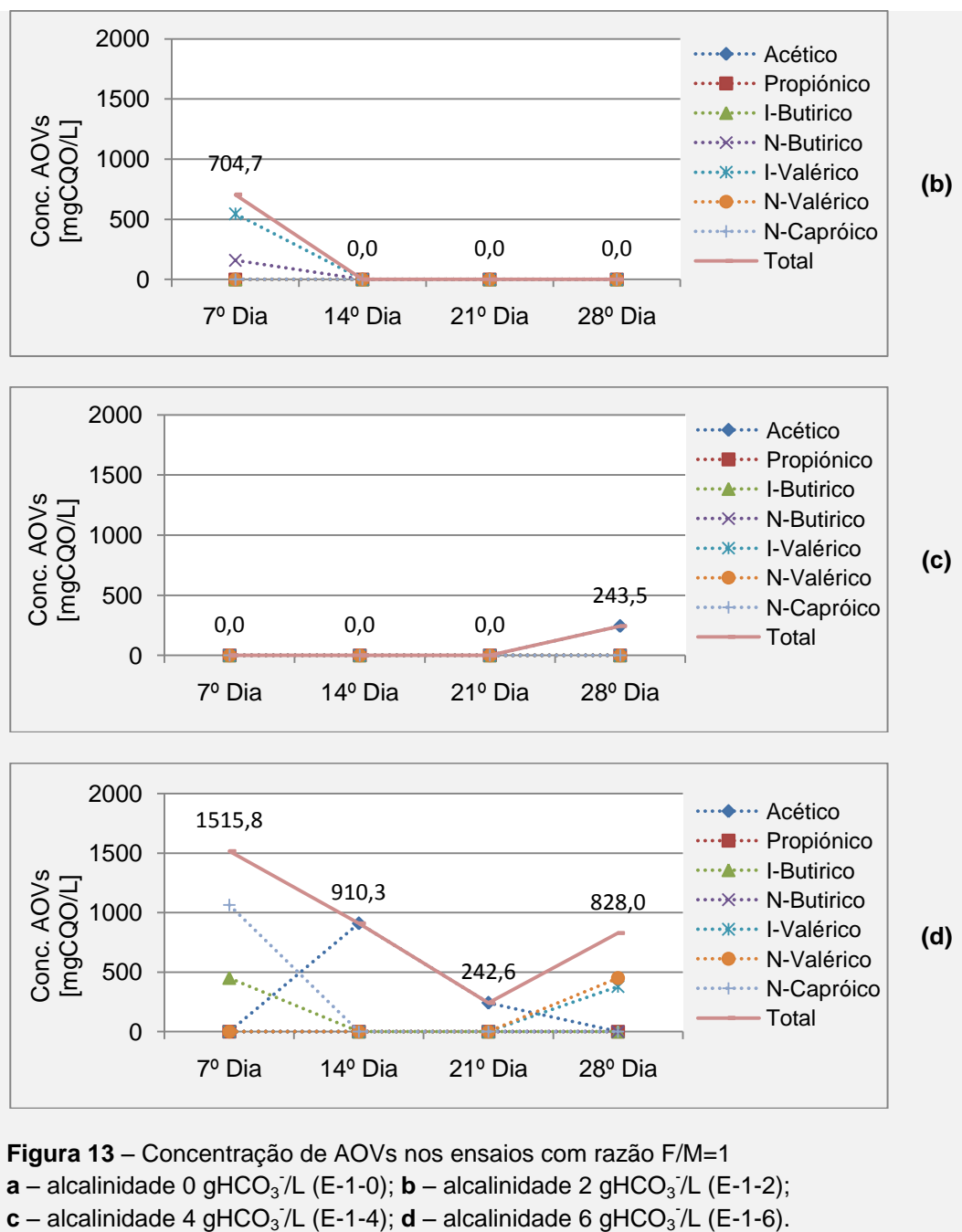


Figura 12 – SSV e SST final nos ensaios com rácio F/M=1 - Fase II

O ensaio E-1-6 é aquele apresenta globalmente um pH mais baixo e uma maior quantidade de biomassa, o que permite prever que é este o ensaio com maior produção de AOVs, seguido de ensaio E-1-0.

A figura 13 mostra a evolução de cada um dos AOVs, assim como a quantidade total, para os ensaios com uma razão F/M=1, tendo sido adicionadas alcalinidades diferentes.





Na figura 13(a) verifica-se que a concentração de AOVs tem uma evolução inversa em relação ao pH do mesmo ensaio.

No segundo ensaio (Figura 13(b)) os resultados de AOVs foram ainda mais baixos, registando apenas valores na primeira análise, ao fim de uma semana a operar.

Também no ensaio E-1-4 (Figura 13(c)), se registam valores baixos de concentração de AOVs.

No último ensaio (Figura 13(d)) conseguiu-se uma quantidade elevada de AOVs total (grau de acidificação 76%) sendo este o melhor resultado da série de ensaios com o rácio F/M=1.

Para este rácio F/M de 1, o ensaio com alcalinidade de 6 gHCO₃⁻/L é claramente aquele que apresenta melhores resultados atingindo 1500 mgCQO/L de AOVs.

Na generalidade, a quantidade de AOVs existente diminui na segunda e terceira semanas e sobe na durante a última semana o que leva a concluir que há consumo de ácidos durante os ensaios (ocorrência de outros passos do processo anaeróbio). O comportamento do pH é o inverso. Sobe na segunda e terceira semanas, estabilizando ou descendo na ultima semana.

5.2.2. RESULTADOS DOS ENSAIOS COM RÁCIO F/M=2

Os valores de pH, nos ensaios com rácio F/M=2, também registam uma tendência de subida (Figura 14), principalmente os ensaios de menor alcalinidade (E-2-0 e E-2-2).

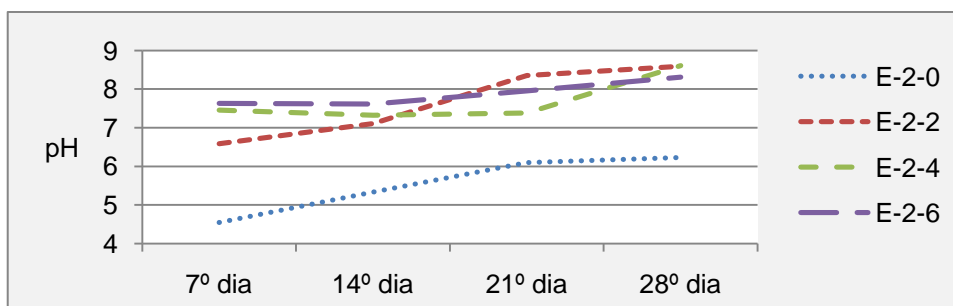


Figura 14 - pH nos ensaios com rácio F/M= 2 – Fase II

Nestes ensaios com 4 gCQO/L de substrato verifica-se que a biomassa final é ligeiramente superior aos valores determinados no grupo de ensaios anterior o que esta de acordo com a maior disponibilidade de substrato. No entanto continua a ser nos extremos de alcalinidade, 0 e 6 gHCO₃⁻/L, que se encontra mais biomassa e, em ambos os casos, acima da concentração inicial de 2 gSSV/L, o que se traduz em crescimento efectivo da biomassa.

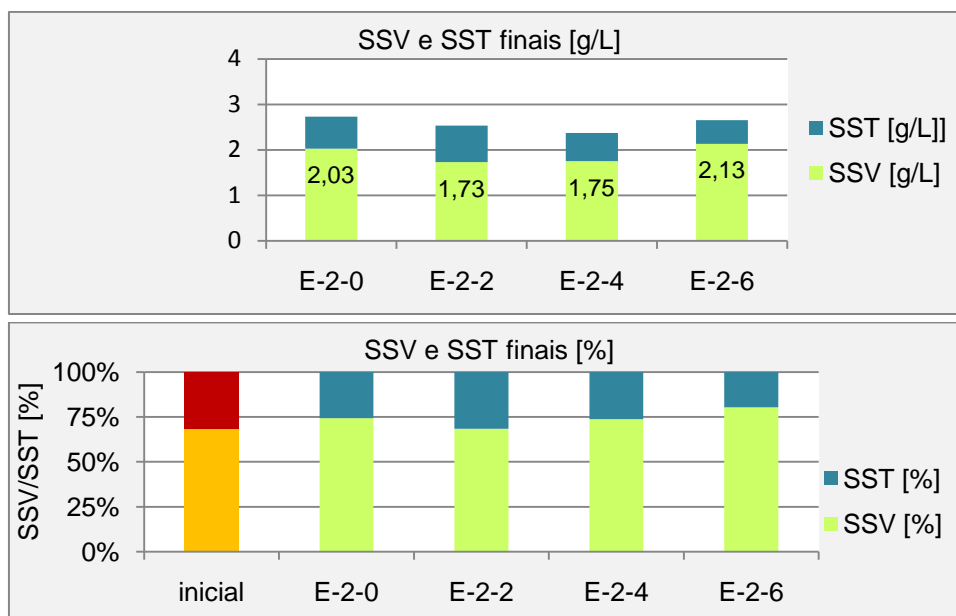
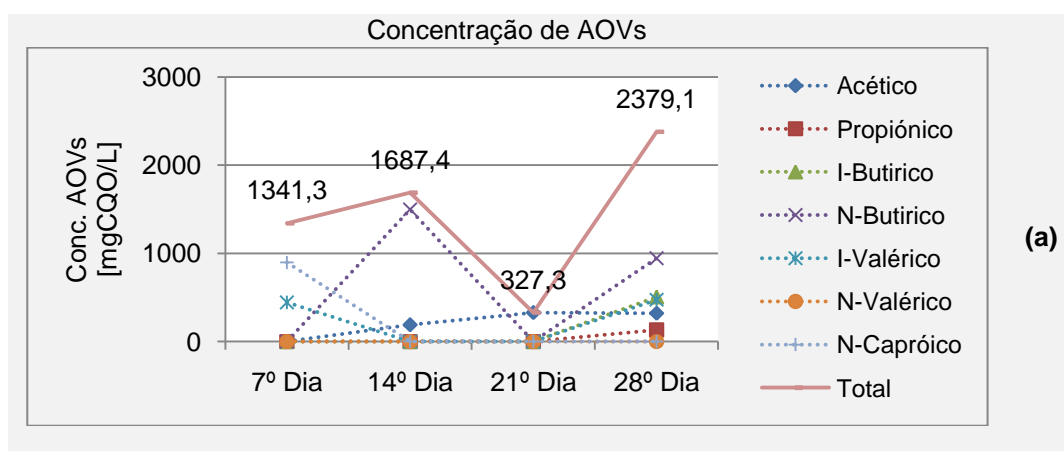


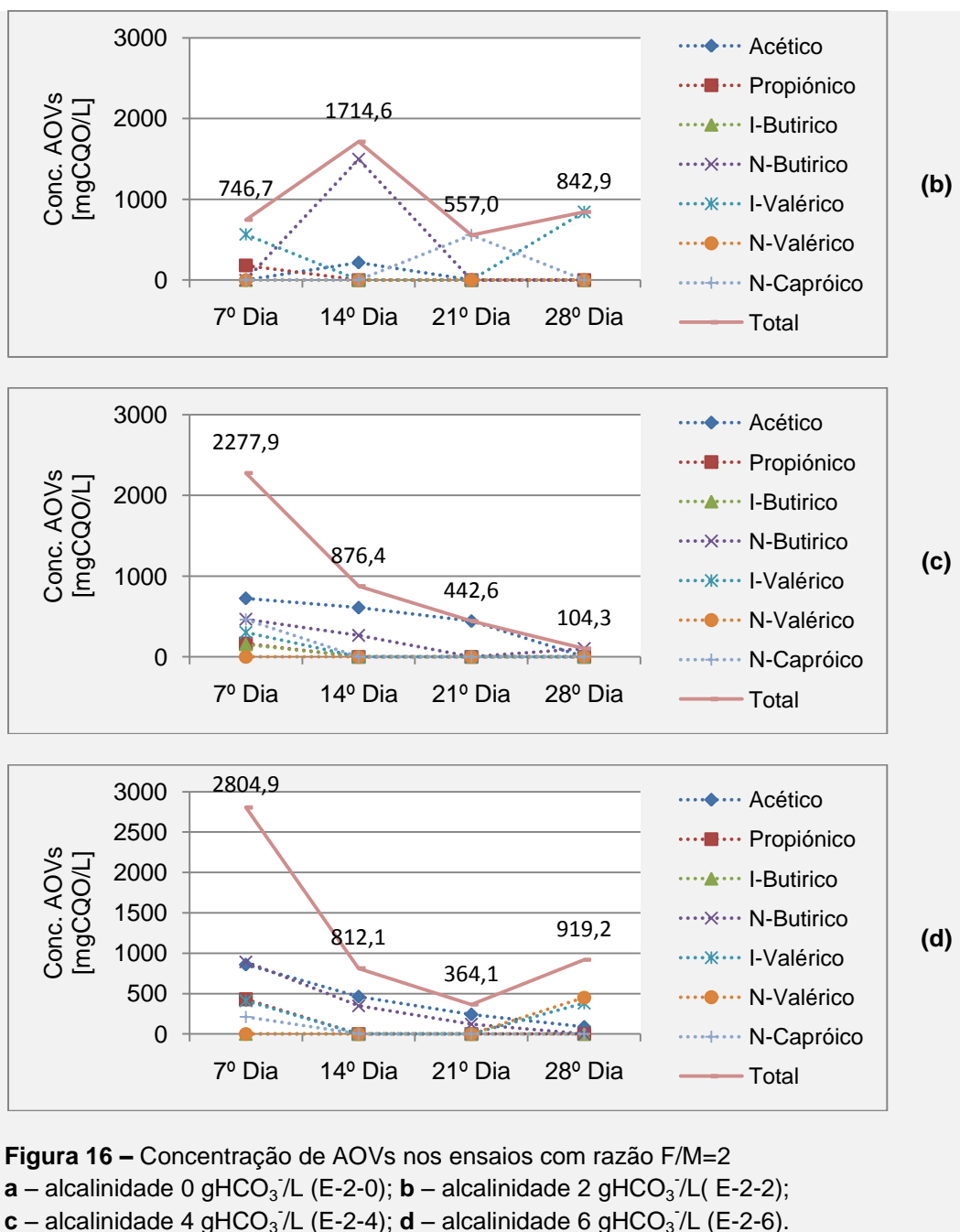
Figura 15 –SSV e SST finais nos ensaios com rácio F/M=2 - Fase II

Os ensaios com 4 gSSV/L e 0 e 2 gHCO₃⁻/L (Figuras 16(a) e 16(b)) registam um máximo de produção de AOVs na segunda semana, cerca de 1700 mgCQO/L em ambos os casos. Desce na terceira semana e sobe de novo na última semana, o que coincide com a estabilização do pH em torno de 6, de modo análogo aos ensaios com F/M=1. O ácido produzido foi maioritariamente o N-butírico.

Nos ensaios com F/M=2, verifica-se que as concentrações máximas de AOVs são superiores às obtidas para os ensaios F/M=1.

O ensaio E-2-6 (Figura 16(d)), com 6 gHCO₃⁻/L de alcalinidade é também nesta série aquele que apresenta um máximo de AOVs total mais elevado (2800 mgCQO/L). Neste ensaio também se verificou o consumo de AOVs na segunda e terceira semanas.





5.2.3. RESULTADOS DOS ENSAIOS COM RÁCIO F/M=3

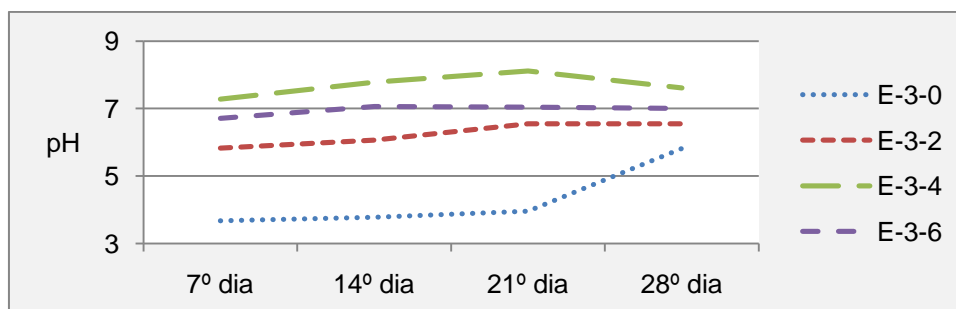


Figura 17 - pH nos ensaios com rácio F/M= 3 – Fase II

Com o rácio F/M igual a 3 (três) os pH medidos apresentam valores inferiores aos obtidos com os rácios mais baixos apresentados anteriormente, com apenas uma situação a exceder o pH 8. Espera-se assim maiores concentrações de AOVs.

Na Figura 18 destaca-se a biomassa do ensaio E-3-4 que é claramente inferior à dos restantes ensaios (2,29-2,58gSSV/L) e coincide com o ensaio que apresenta valores de pH mais elevados. Ensaios com alcalinidades 0 e 6 gHCO₃⁻/L, voltam a ser aqueles com maior biomassa no final.

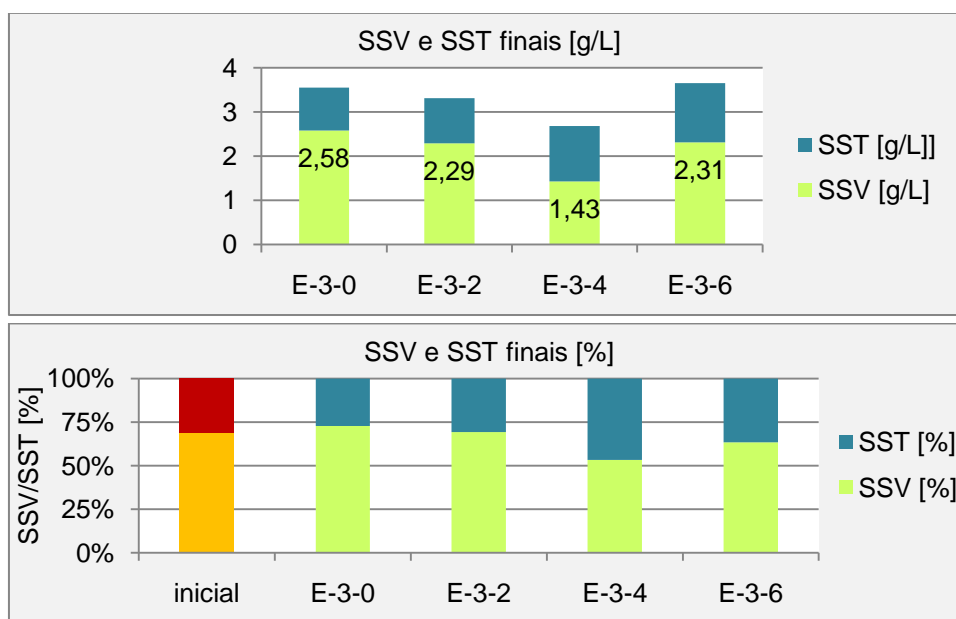


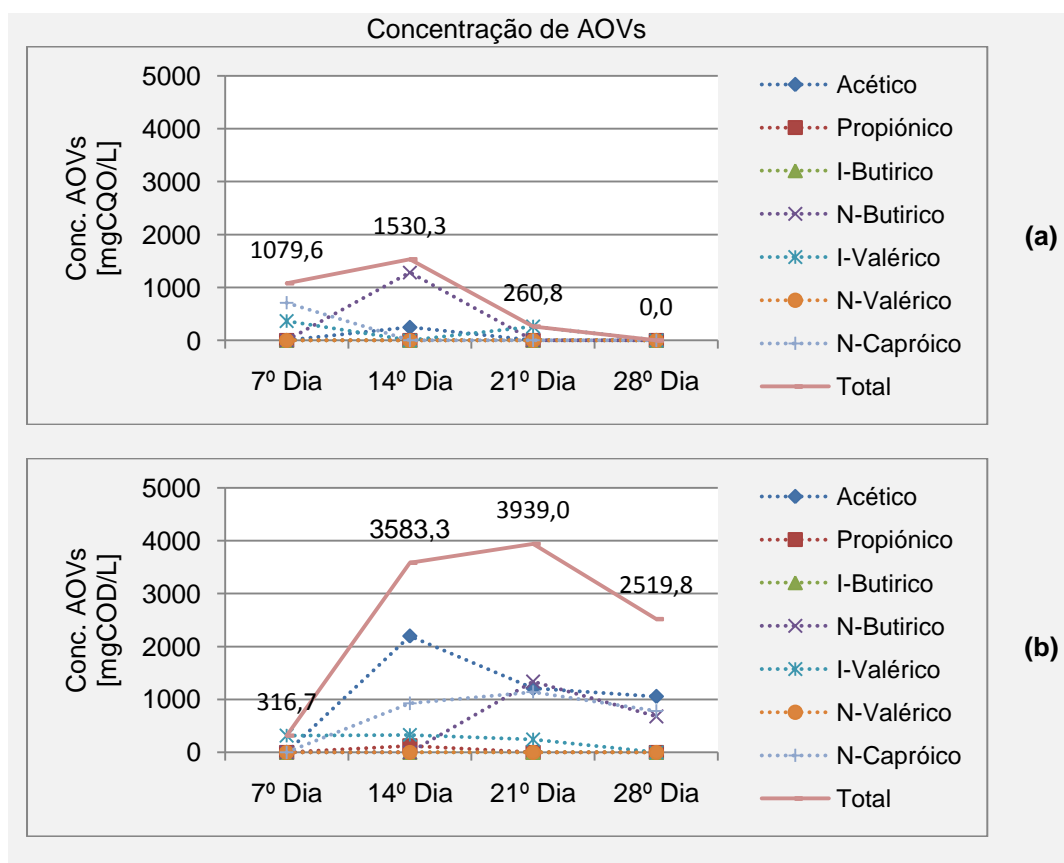
Figura 18 – SSV e SST finais nos ensaios com rácio F/M=3 - Fase II

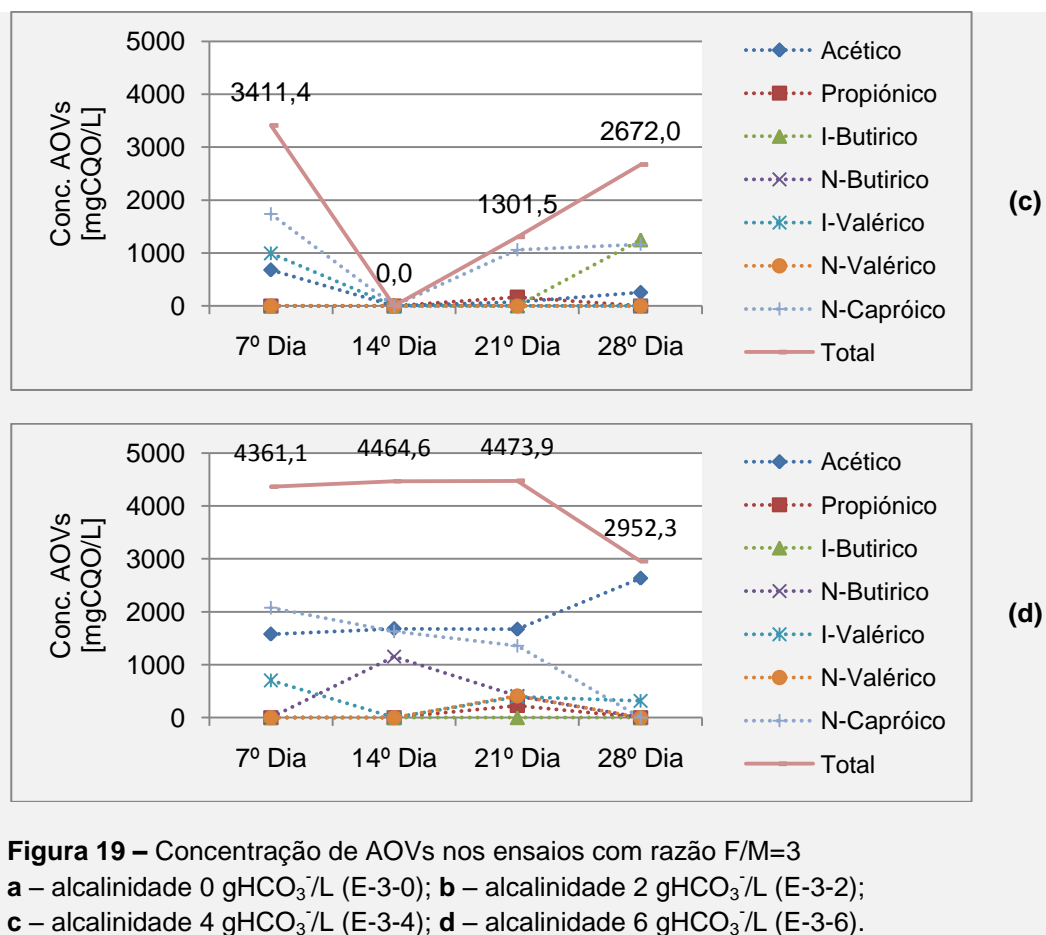
No ensaio sem alcalinidade, figura 19(a), os ácidos presentes durante as 3 (três) primeiras semanas são completamente consumidos na última semana. Este acontecimento coincide com a subida do pH de 4 para 6.

No ensaio E-3-2, atinge-se sensivelmente os 4000 mgCQO/L de AOVs, que é o melhor valor de todos os ensaios até ao momento, e a concentração de ácido acético ultrapassa pela primeira vez os 2000 mgCQO/L entre todos os ensaios anteriores.

No ensaio E-3-4 (Figura 19(c)) do grupo de ensaios com rácio F/M=3 destaca-se uma queda na concentração de AOVs bastante acentuada no final da segunda semana provavelmente devido ao facto de ser o ensaio com pH mais elevado e menor quantidade de biomassa..

No ensaio E-3-6, figura 19(d), obtêm-se uma concentração elevada de AOVs total (4400 mgCQO/L), logo na primeira semana. Este valor decresce na última análise, no 28º Dia. No entanto, é neste dia que se consegue a maior quantidade relativa de ácido acético. Existem cerca de 2600 mgCQO/L de ácido acético em 2950 mg/CQO/L de AOVs total, o que leva a pensar que neste caso houve consumo mas também houve consumo dos outros ácidos excepto acético.





Com este rácio conseguiu-se maiores valores de AOVs total. A melhoria de produção de ácido acético também é bastante relevante. Em nenhum rácio anterior a concentração de ácido acético superou os 1000 mgCQO/L, e com a esta razão F/M igual a 3 (três) encontram-se valores para o ácido acético acima de 2000 mgCQO/L.

5.2.4. RESULTADOS DOS ENSAIOS COM RÁCIO F/M=4

Os valores de pH são muito semelhantes no caso dos ensaios com os rácios mais baixos e tornam-se progressivamente mais distintos à medida que o rácio F/M aumenta, o que leva a concluir que neste caso a alcalinidade influencia significativamente o comportamento do sistema. Neste caso, com o rácio F/M mais elevado deste estudo, observa-se a maior dispersão de valores, encontrando-se os valores mais baixo (pH inferior a 5 para alcalinidades 0 e 2 gHCO₃⁻/L) e mais elevados (pH superior a 6 para alcalinidades de 4 e 6 gHCO₃⁻/L).

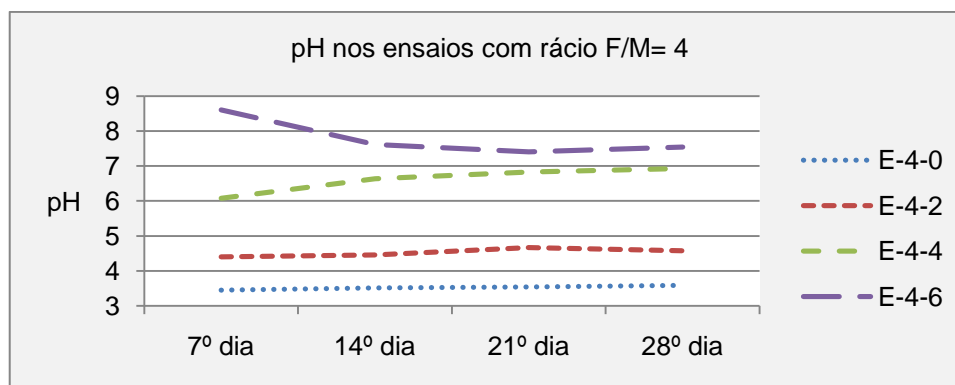


Figura 20 - pH nos ensaios com rácio F/M= 4 – Fase II

Ao contrário dos resultados anteriores, não são os ensaios com alcalinidades 0 e 6 gHCO₃⁻/L que registam maior biomassa, mas são os dois com alcalinidade mais baixa, nomeadamente 0 e 2 gHCO₃⁻/L. Os dois últimos ensaios registam biomassa final inferior a 2 gSSV/L (1,7-1,9 gSSV/L).

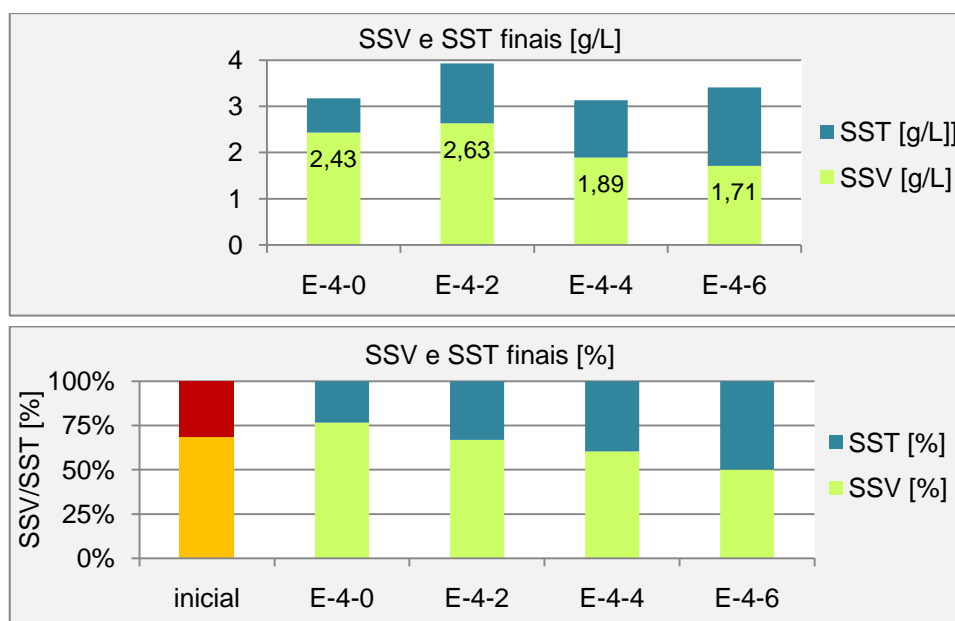


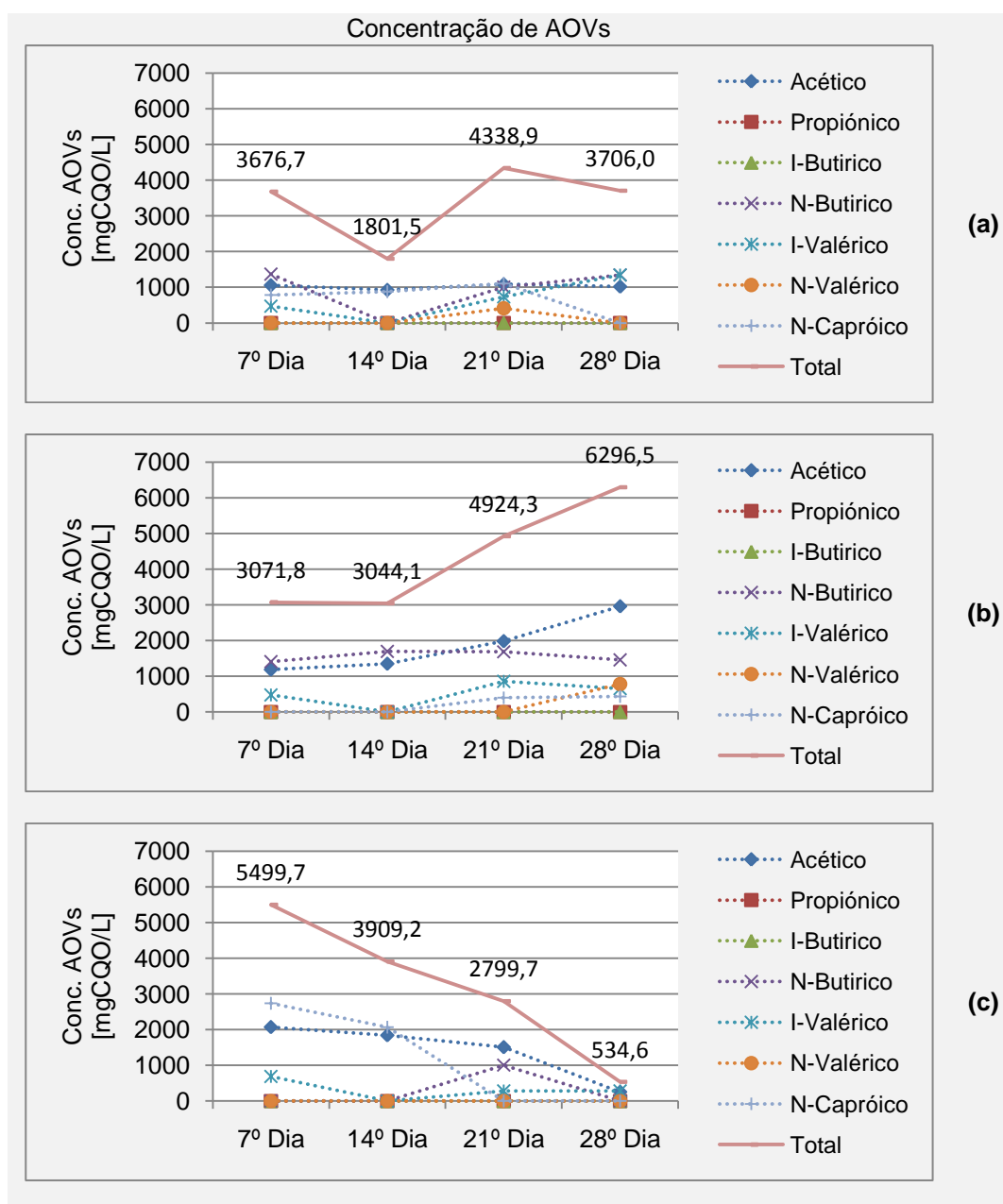
Figura 21 – SSV e SST finais nos ensaios com rácio F/M=4 - Fase II

No ensaio E-4-0 (Figura 22(a)) a concentração de AOVs total mantém-se ao longo das 4 (quatro) semanas, facto inédito nos restantes ensaios, provavelmente devido ao pH extremamente baixo (~3,5), conseguindo-se uma produção de AOVs total considrável (1800-4300 mgCQO/L).

No ensaio E-4-2 (Figura 22(b)) a adição de 2 gHCO₃⁻/L de alcalinidade permitiu subir o pH para cerca de 4,5, o que permitiu uma maior produção de AOVs total. Atinge cerca de 6300mgCQO/L de AOVs total, na ultima semana, ao contrário de todos os restantes ensaios. Provavelmente não houve consumo de AOVs devido ao baixo valor de pH.

O ensaio E-4-4 (Figura 22(c)) é aquele que apresenta um valor máximo de concentração de AOVs total superior na primeira semana, atingindo 5500 mgCQO/L de AOVs. Conseguiu atingir o valor mais elevado, apesar de registar ligeira diminuição da biomassa. Atingiu o máximo no momento em que o pH era 6, que é um valor apropriado para a produção de AOVs, tendo havido consumo com a subida do pH.

No ensaio E-4-6 (Figura 26(d)), ao contrário dos ensaios anteriores, verifica-se que a alcalinidade de 6 gHCO₃/L se revelou prejudicial à produção de AOVs. A concentração de AOVs não atinge 2000 mgCQO/L.



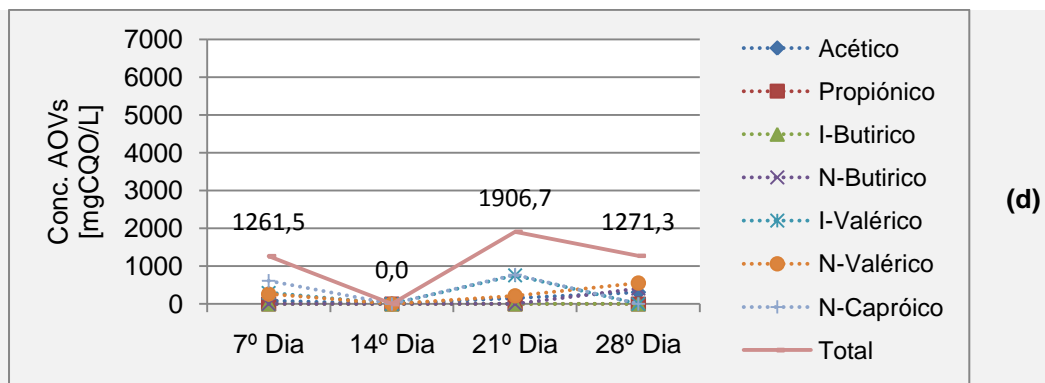


Figura 22 – Concentração de AOVs nos ensaios com razão F/M=4

a – alcalinidade 0 gHCO₃⁻/L (E-4-0); **b** – alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L (E-4-2); **c** – alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L (E-4-4); **d** – alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L (E-4-6).

5.2.1. SUPERFÍCIES DE RESPOSTA

Com o objectivo de avaliar o comportamento do sistema relativamente à influência da razão F/M e da adição de alcalinidade foi utilizada a metodologia de superfície de resposta.

Esta metodologia de permite analisar duas variáveis de uma vez. Como foram analisadas duas variáveis, Rácio F/M e Alcalinidade, foi construída a superfície de resposta da Figura 23 com base nas concentrações máximas de AOVs dos ensaios desta fase. A superfície foi construída utilizando o Software Statsoft Statistica 8.

3D Surface Plot of Conc. AOVs [mgCQO/L] MAX against Razão F/M and Alk [HCO₃⁻/L]
 $C \text{ [mgAOVs/L] MAX} = -2286,8239 + 2106,9427 \cdot x + 817,1151 \cdot y - 96,9553 \cdot x \cdot x - 128,4959 \cdot x \cdot y - 72,8696 \cdot y \cdot y$

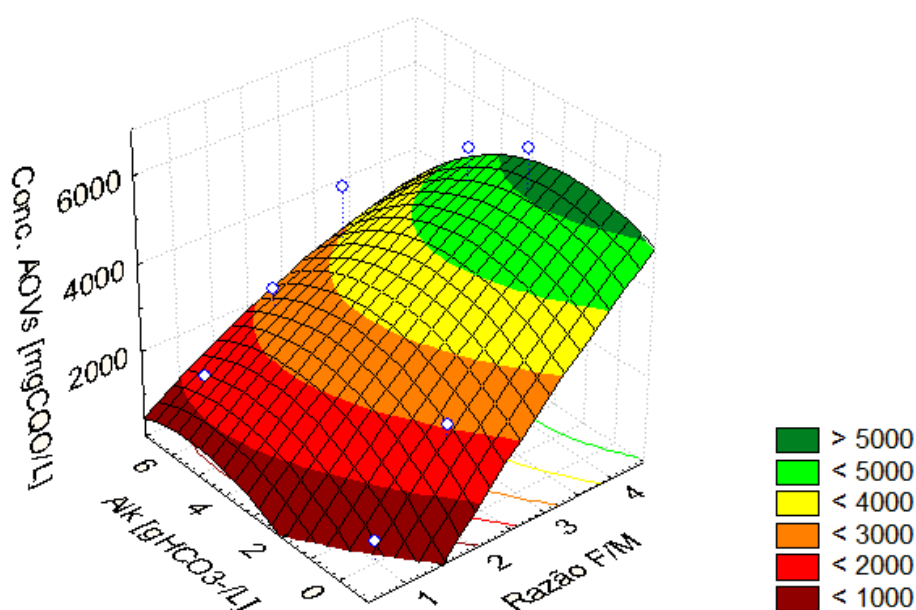


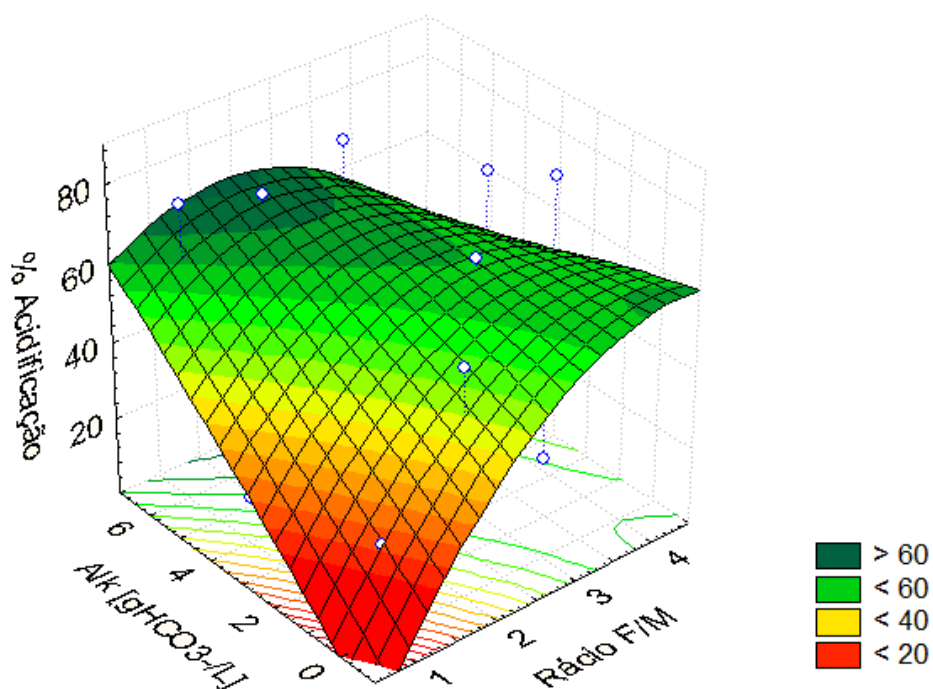
Figura 23 - Superfície de resposta para a concentração Max. de AOVs – Fase II

Verifica-se que há maior produção de AOVs total nas situações com mais substrato (8 gCQO/L). Esta superfície de resposta indica que o máximo de produção de AOVs se obtém com rácio F/M igual a 4 (quatro) e alcalinidade de 2 gHCO₃⁻/L. De facto é também nesta situação que nos resultados experimentais se atingiu maior concentração de AOVs (6297mgCQO/L). Todos os ensaios com rácio F/M=4 produziram mais de 4000 mgCQO/L, excepto o ensaio com 6 gHCO₃⁻/L que não atingiu os 2000 mgCQO/L de AOVs total. Entre os ensaios com rácio F/M inferiores a 4, o resultado experimental que se destaca é o do ensaio E-3-6, com Razão F/M=3 e alcalinidade 6g HCO₃⁻/L, tendo atingido cerca de 4500 mgCQO/L de AOVs total.

Já se observou que se encontram as maiores concentrações de AOVs total nos ensaios com mais quantidade de substrato. No entanto, estas são as concentrações máximas absolutas. Para estudar o grau de acidificação foi realizada outra superfície de resposta, representada na Figura 24, onde se pode observar a quantidade de AOVs produzidos em relação à quantidade de substrato fornecido.

3D Surface Plot of % Acidificação against Rácio F/M and Alk

$$\% \text{ Acidificação} = -19,525 + 40,1125 \cdot x + 11,1438 \cdot y - 5,0625 \cdot x \cdot x - 3,025 \cdot x \cdot y - 0,1406 \cdot y \cdot y$$

**Figura 24** - Superfície de resposta para o grau de acidificação – Fase II

A superfície indica que o grau de acidificação é maior nas situações com menos quantidade de substrato (2 e 4 gCQO/L), ou seja, rácio F/M=1 e 2, e alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L, com cerca de 70% de acidificação. Os ensaios cujos resultados experimentais superaram os 70% foram: E-1-6, E-3-6 e E-4-2.

Os AOVs mais importantes na produção de biopolímeros são o Acético, o Propiónico e o I-butírico. Sendo assim, há todo o interesse em verificar que condições operatórias conduzem a maiores quantidades relativas destes ácidos. Neste sentido foi realizada uma terceira superfície, representada na figura 25.

3D Surface Plot of AOVs interesse/AOVs total against Rácio F/M and Alk

$$\text{AOVS interesse/AOVs total} = -79,85 + 94,7 \cdot x + 6,325 \cdot y - 15,5 \cdot x^2 - 4,55 \cdot x \cdot y + 1,6875 \cdot y^2$$

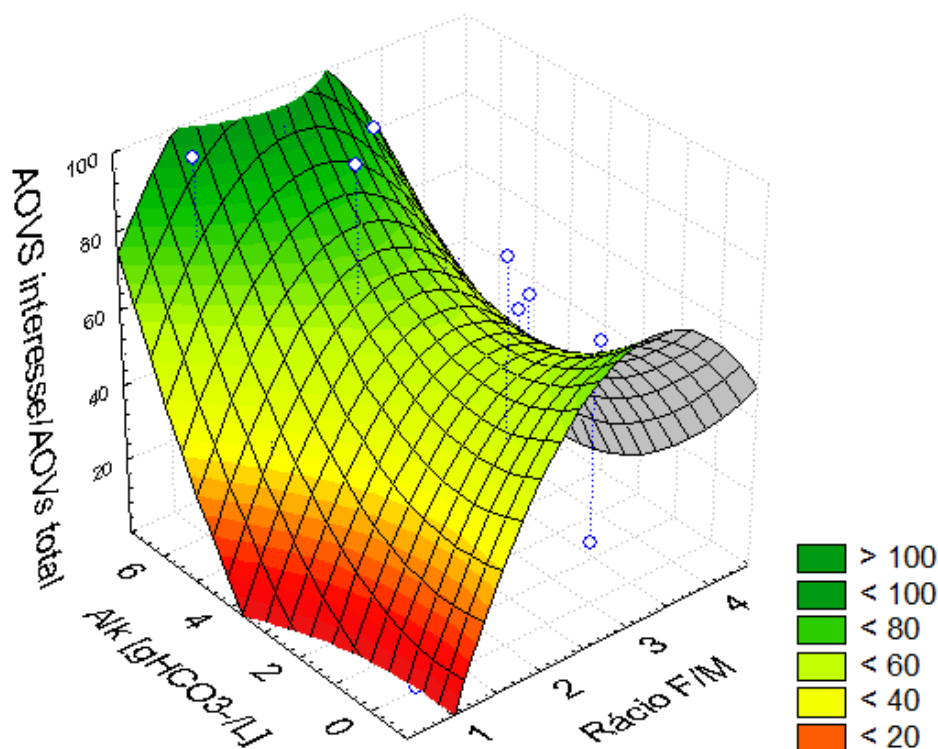


Figura 25 - Superfície de resposta para % AOVs úteis na produção de biopolímeros

A Figura 25 evidencia o rácio F/M=3 e as alcalinidades mais elevadas como sendo as condições que conduzem a maiores percentagens dos 3 ácidos enunciados anteriormente. Com rácio F/M=1 não se produziu nenhum destes 3 ácidos, à excepção do ensaio com alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L. Com razão F/M=2 encontram-se dois valores de 100%, mas que correspondem a apenas 327-443 mgCQO/L de ácido acético. Com a razão F/M=3, o ensaio com alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L foi o que conduziu a uma percentagem maior de produção de AOVs de interesse (89%). Com razão F/M=4 e alcalinidades de 0 a 4 gHCO₃⁻/L atingem-se percentagens de 47-51%.

5.3. POTENCIAL ACIDOGÉNICO DE VÁRIOS SUBSTRATOS - FASE III

Na Fase III, testou-se o potencial acidogénico de vários substratos, utilizando as 3 (três) condições que obtiveram melhores resultados com o soro de leite: Razão F/M=4 e alcalinidade 2 e 4 gHCO₃⁻/L e F/M=3 e alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L.

Neste terceira fase fez-se mais uma análise ao AOVs (pH e biogás) que na fase anterior, a meio da primeira semana, ao 3º (terceiro) dia. Isto deve-se ao facto de vários resultados

da Fase II indicarem acidogénese máxima logo na primeira análise, ao 7º (sétimo) dia e depois apresentarem um declínio nas semanas seguintes. Devido a isto, é importante ter informação sobre a acidogénese antes do 7º (sétimo) dia, pois o máximo de acidogénese poderá se encontrar nesse intervalo.

Os ensaios estão identificados da forma X-y-z em que X corresponde ao substrato, y corresponde ao valor do rácio F/M e z corresponde ao valor da alcalinidade em gHCO_3^-/L . A letra S refere-se ao substrato soro de leite, a letra G ao glicerol, a letra V ao efluente vínico, a letra F ao FORSU, a letra L ao efluente de lagares de azeite e a letra B aos ensaios sem substrato (Branco).

5.3.1. GLICEROL

O pH dos ensaios com glicerol apresenta uma forte tendência de subida em dois ensaios (Figura 26), aproximar-se de pH 9 (nove) no final, o que não indicia boas condições para a acidogénese.

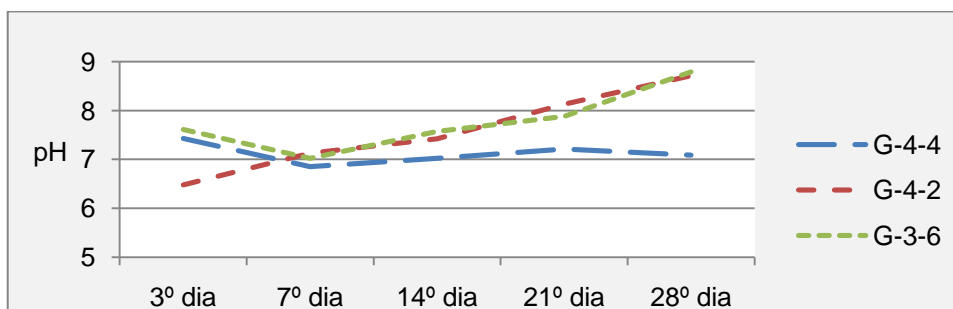
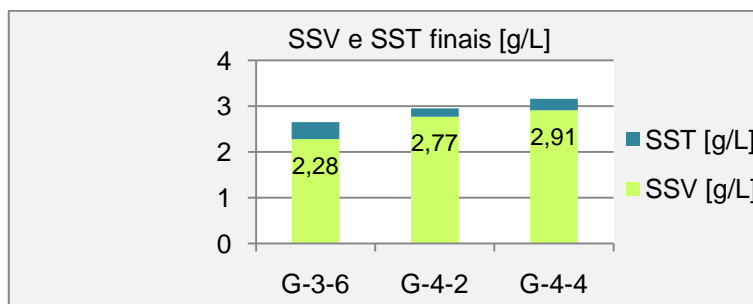


Figura 26 - pH nos ensaios com substrato glicerol – Fase III

Ao contrário destes, o ensaio com rácio F/M=4 e Alcalinidade de 4 gHCO_3^-/L (G-4-4) apresenta um pH constante por volta do valor 7 (sete), o que permite antever melhor potencial acidogénico e até melhores condições para a actividade microbológica.

Os resultados da análise à biomassa (SSV) final destes ensaios confirmam que há mais biomassa no ensaio G-4-4 que nos restantes (figura 27), o que indicia que a percentagem de voláteis aumentou, situando-se entre 86 e 92%.



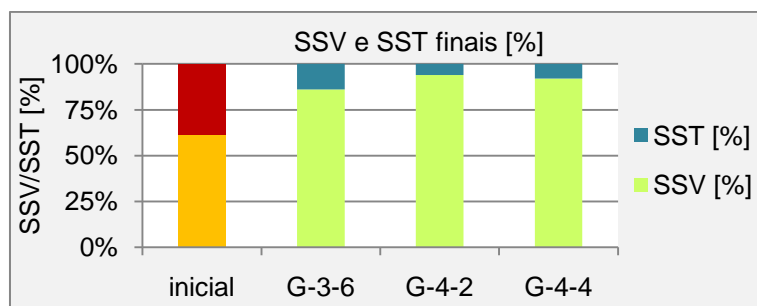
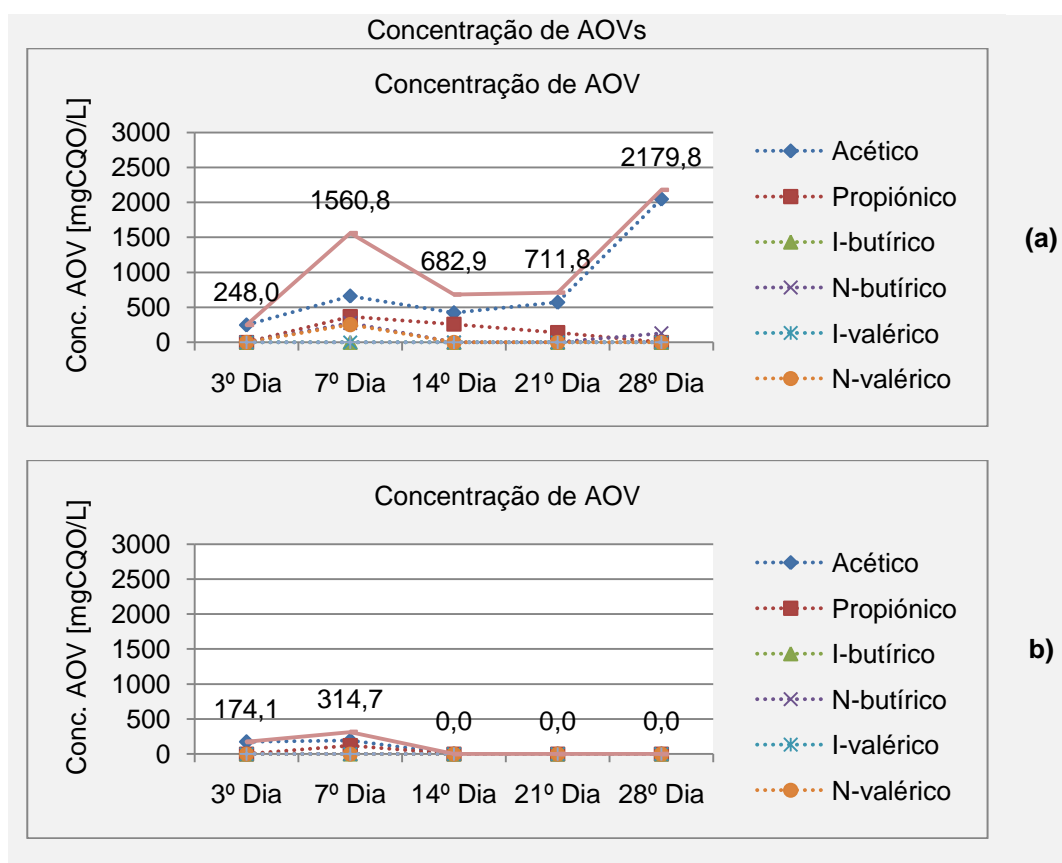


Figura 27 – SSV e SST finais nos ensaios com glicerol - Fase III

Os resultados das análises aos AOVs corroboram as expectativas de maior potencial acidogénico no ensaio G-4-4, sugeridas pelos dados relativos ao pH e à biomassa. Entre os 3 (três) ensaios, o ensaio G-4-4 é nitidamente aquele que apresenta uma maior concentração total de AOVs (Figura 28(a)). Além de maior concentração total de AOVs, atingindo cerca de 2200mg/L também apresenta uma concentração considerável de ácido acético. Se a aplicação da acidogénese for a produção de polihidroxialcanoatos a concentração desta ácido é muito importante, pois é o substrato de carbono facilmente assimilável na produção de PHAs (Adeline et al, 2003).



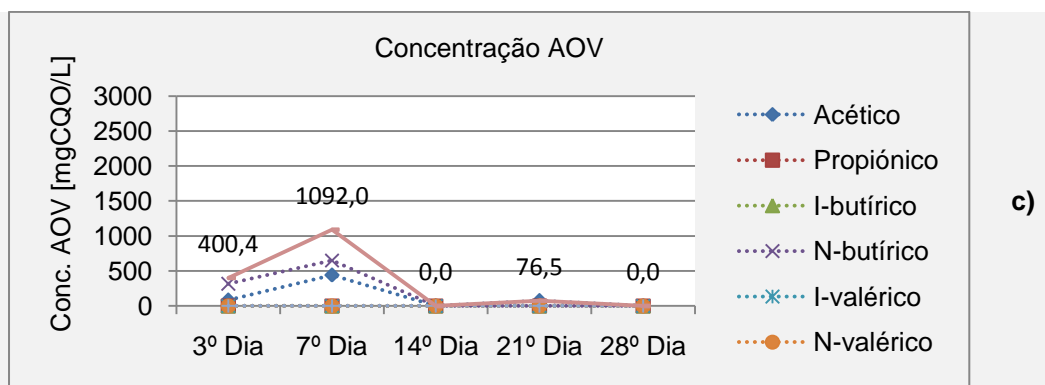


Figura 28 – Concentração de AOVs nos ensaios com glicerol

a – Razão F/M= 4 e alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L (G-4-4); **b** – Razão F/M=4 e alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L (G-4-2); **c** – Razão F/M=3 e alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L (G-3-6);

O ensaio com o substrato glicerol e com rácio F/M=4 e alcalinidade de 2 gHCO₃⁻/L (G-4-2) tem resultados extremamente baixos, não atingindo os 350 mgCQO/L. Este ensaio permite verificar a importância da alcalinidade no comportamento do sistema. Assim, a descida da alcalinidade de 4 gHCO₃⁻/L para 2 gHCO₃⁻/L fez a diferença entre um bom resultado, principalmente em termos de concentração de ácido acético, e um resultado muito baixo.

O último ensaio com substrato glicerol aqui apresentado, com rácio F/M=3 e alcalinidade de 6 gHCO₃⁻/L (G-3-6), também manifesta resultados modestos (Figura 28(c)). De referir que atinge máximos de AOVs (cerca de 1100 mgCQO/L) quando registou o pH mais baixo, muito próximo do valor 7, revelando assim a importância de manipular o pH na optimização da acidogénese.

5.3.2. SORO DE LEITE

Os ensaios com soro de leite são praticamente a repetição de outros já efectuados na Fase II. A diferença está no inóculo que, apesar de estar presente nestes ensaios com a mesma concentração e de ter sido recolhido no mesmo local, não tem exactamente as mesmas características. Estas diferenças revelaram-se importantes nos resultados, pelo que foi importante a sua realização.

O pH nos ensaios com este substrato, ao contrário do caso anterior, manifesta claramente a influência da alcalinidade adicionada sendo os ensaios com alcalinidade mais elevada aqueles que apresentam sempre pH mais elevado e o ensaio com alcalinidade mais baixa aquele que apresenta pH mais baixo (Figura 29).

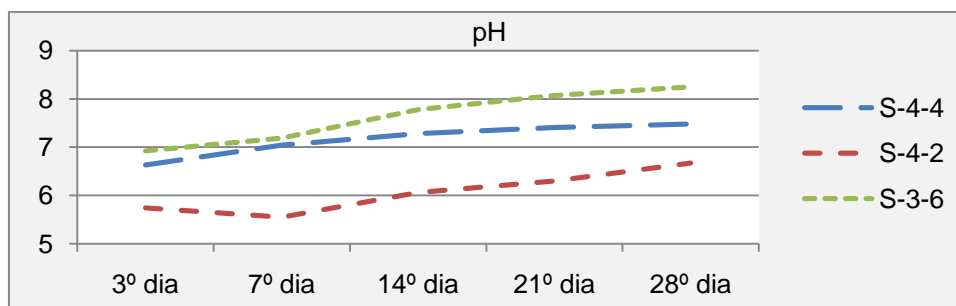


Figura 29 - pH nos ensaios com substrato soro de leite – Fase III

Em relação aos ensaios similares da Fase II, os resultados da Fase III apresentam sempre pH mais elevado e tendência de subida mais forte, indicando piores condições para a acidogénese. Ou, por outras palavras, indicam que o inóculo não é tão adequado para a acidogénese como o utilizado na Fase II.

O ensaio com rácio F/M=4 e alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L (S-4-2) foi o que manifestou maior concentração de biomassa (Figura 30) e também foi aquele em que se observou pH ácido, pelo que se pode antever que é este ensaio, entre os que têm substrato soro de leite, aquele que tem maior potencial acidogénico.

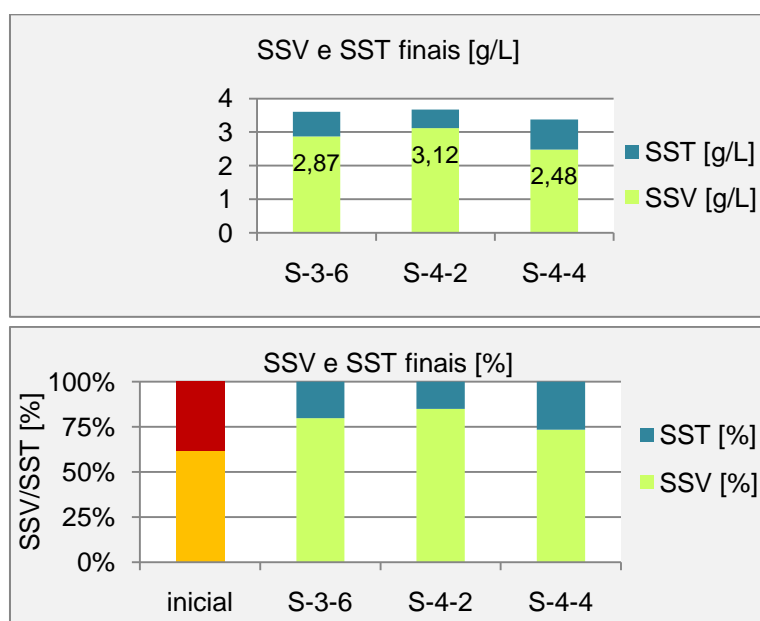
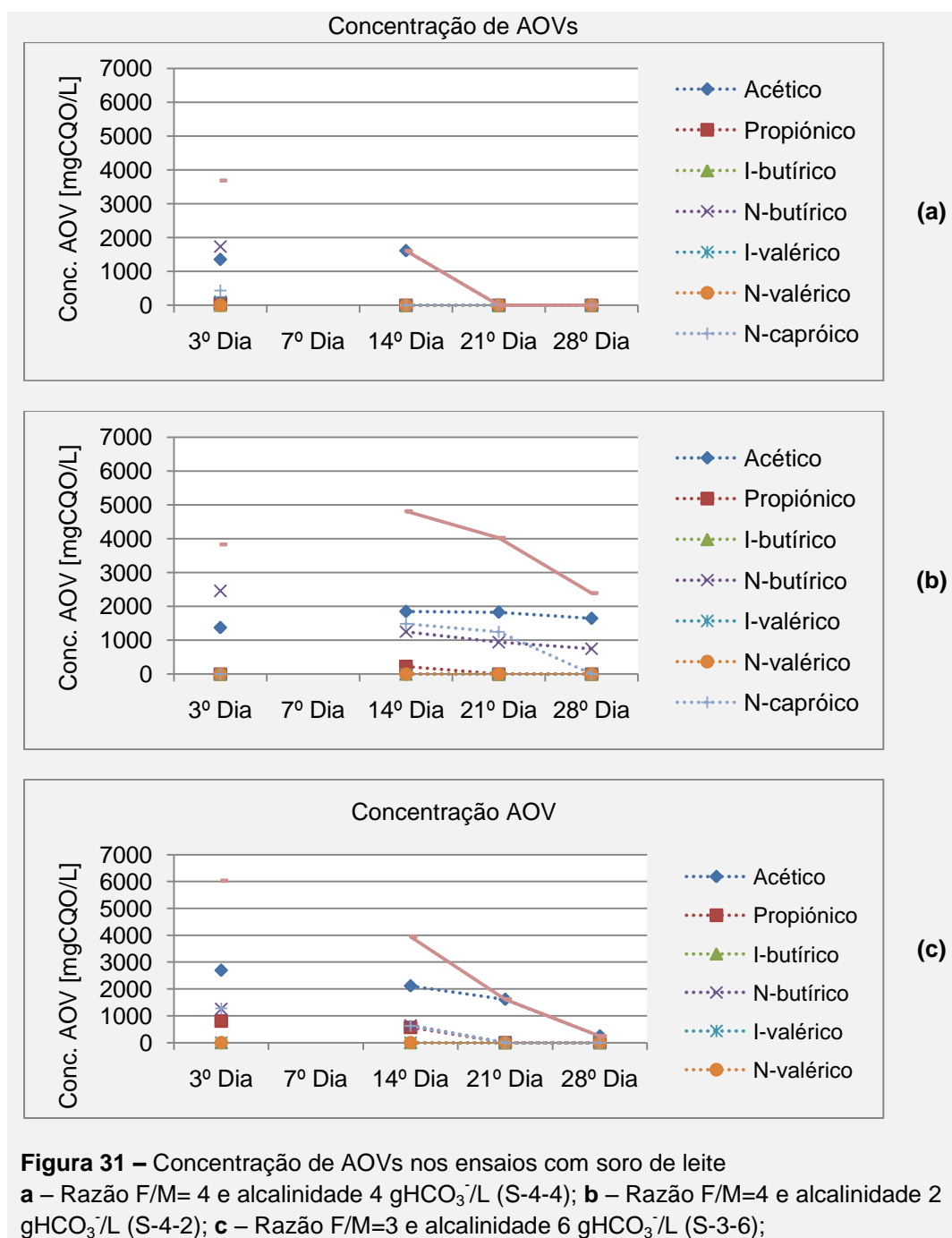


Figura 30 – SSV e SST final nos ensaios com soro de leite - Fase III

Houve o desaparecimento das amostras relativas ao 7º dia, o que limitou a análise de resultados, mas onde ainda assim é possível tecer algumas considerações importantes.

No ensaio com o mesmo substrato, mesmo rácio F/M e mesma alcalinidade (4 gHCO₃⁻/L) da Fase II, houve também um declínio na concentração máxima de AOVs nos ultimas

semanas, mas bastante menos acentuado que neste caso. Confirma-se assim a qualidade inferior do inóculo para acidogénese utilizado nesta terceira fase.



No ensaio com F/M=4 e alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L, Figura 31(b), encontram-se quantidades relevantes de AOVs, chegando a superar largamente, no dia 14, os 3000 mgCQO/L de AOVs atingidos pelo ensaio similar da Fase II, no mesmo dia. Mas revela um comportamento diferente, tendo uma tendência descendente nas ultimas semanas, ao contrário do similar que tem uma tendência ascendente nas ultimas semanas.

Neste último ensaio com soro (figura 31(c)) verificam-se também valores muito significativos de AOVs total e de ácido acético. É o único ensaio da Fase III que atinge a fasquia dos 6000 mgCQO/L de AOVs e em muito pouco tempo de reacção (3 dias). E é possível que se tenham atingido valores maiores ao fim da primeira semana. Mas também se verifica uma forte queda nas ultimas semanas.

Nestes 3 (três) ensaios com este substrato nota-se uma forte correlação entre a subida do pH e a queda de AOVs presentes nos reactores.

5.3.3. EFLUENTE VÍNICO

Uma das funções da alcalinidade é a de estabilizar o pH. Com o efluente vínico esta acção é bem visível (Figura 32). O ensaio com menos alcalinidade, o ensaio V-4-2 que tem 2 gHCO₃⁻/L, apresenta maior instabilidade no valor de pH que os restantes 2 (dois) ensaios. A alcalinidade, por um lado, permite estabilizar o pH beneficiando a actividade microbiana, e por outro lado fazendo subir o pH favorece o consumo de AOVs.

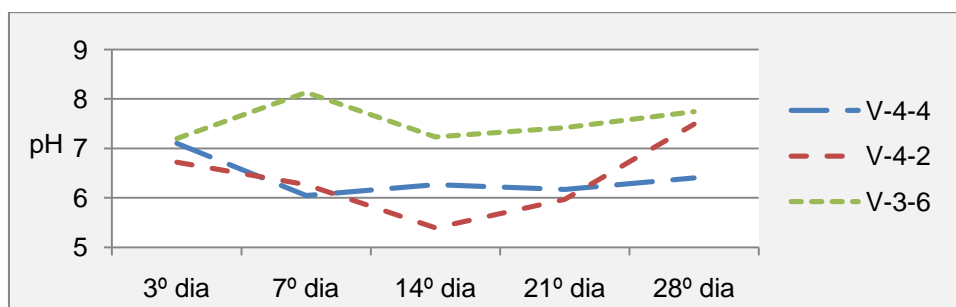


Figura 32 - pH nos ensaios com efluente vínico – Fase III

Este substrato foi um dos que conduziu a um maior aumento de biomassa, apresentando no final de 2,57 a 3,23 gSSV/L (Figura 33). Relembra-se que a biomassa inicial em todos os ensaios é 2 gSSV/L e o ensaio com efluente vínico, rácio F/M=4 e alcalinidade de 4 gHCO₃⁻/L (V-4-4) tem mais de 3g SSV/L no final.

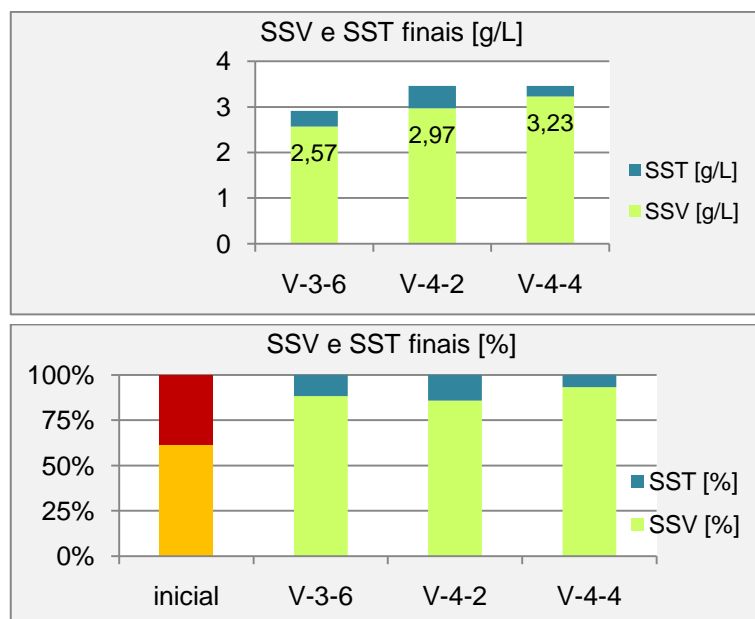
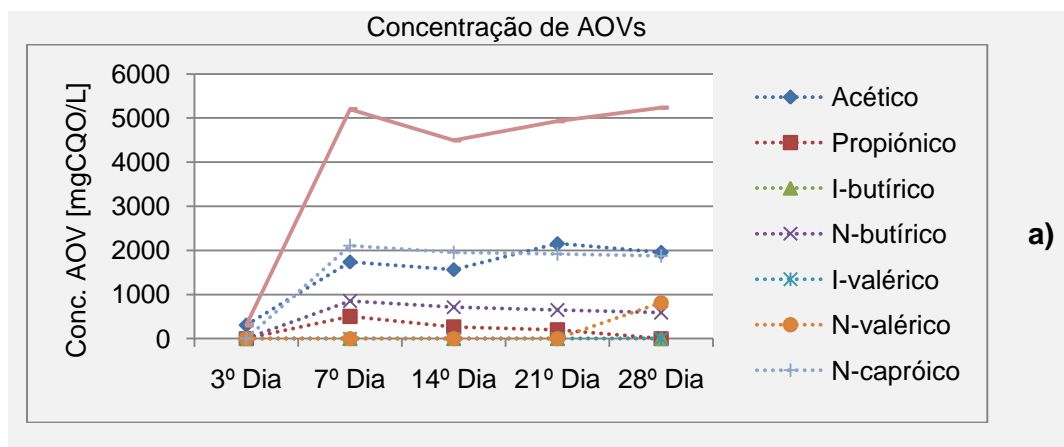


Figura 33 – SSV e SST finais nos ensaios com efluente vínico - Fase III

O ensaio V-4-4 (Figura 34(a)) excedeu valores de 5000 mgCQO/L de AOVs total. Estes valores não se encontram em nenhum outro substrato, para além do soro de leite. Para além do elevado potencial acidogénico, superou os 5000 mgCQO/L de AOVs total logo ao 7º (sétimo) dia e é o único ensaio em que se consegue observar a manutenção de elevadas concentrações de AOVs ao longo de pelo menos 21 dias, o que denota que o pH rondando o valor de 6 não favorecerá o consumo de AOVs.



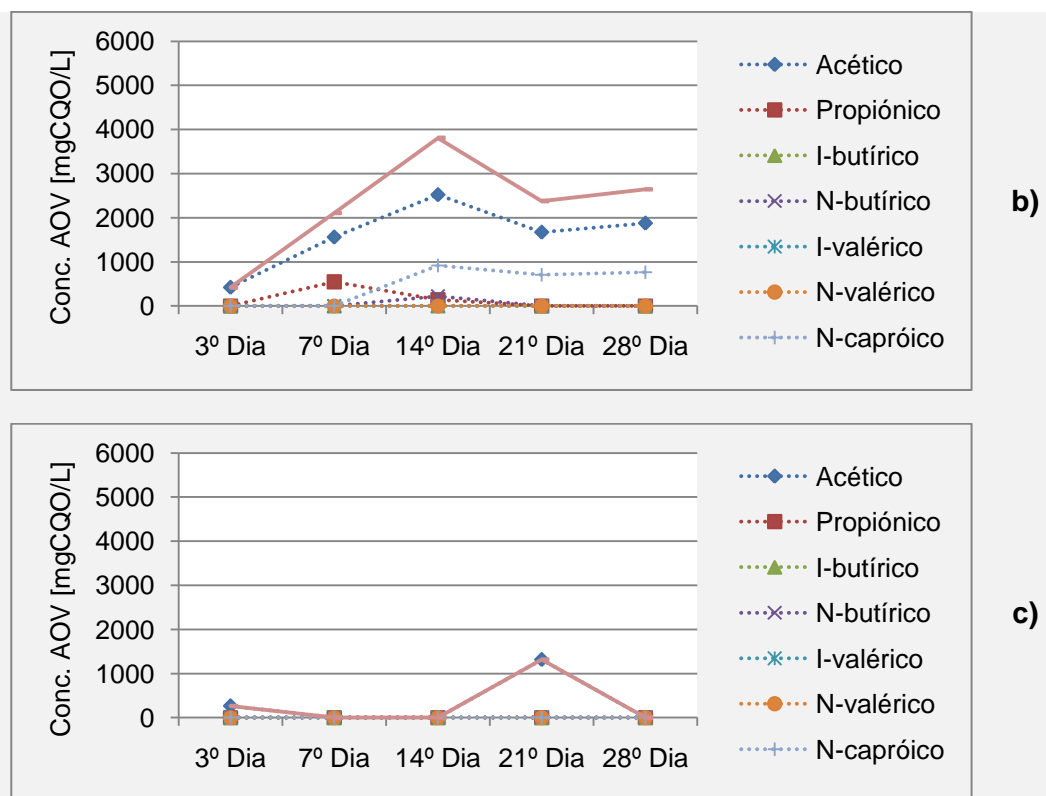


Figura 34 – Concentração de AOVs nos ensaios com efluente vínico

a – Razão F/M= 4 e alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L (V-4-4); **b** – Razão F/M=4 e alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L (V-4-2); **c** – Razão F/M=3 e alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L (V-3-6).

O ensaio V-4-2, também com o substrato efluente vínico (Figura 34(b)) e com menor alcalinidade atingiu valores de AOVs mais baixos, mas ainda assim interessantes principalmente se o objectivo for produzir ácido acético. E tal como o ensaio anterior com o mesmo substrato, verificou-se estabilização nas concentrações de AOVs após a subida inicial.

Depois de dois ensaios com substratos apresentarem resultados interessantes, este último ensaio, V-3-6 (Figura 35(c)), com rácio F/M=3 e alcalinidade de 6gHCO₃⁻/L, não esteve ao mesmo nível. O pH esteve demasiado elevado logo na primeira semana prejudicando a acidogénese. Mas fica a nota de, uma vez mais para este substrato, se verificar alta concentração relativa de ácido acético. Como já foi referido, este é um dos ácidos mais importante para a produção de polihidroxialcanoatos (PHAs).

5.3.4. FRACÇÃO ORGÂNICA DE RESÍDUOS SÓLIDOS URBANOS (FORSU)

Com a FORSU, todos os valores de pH se encontram muito próximos uns dos outros, com excepção de um pico que subiu ao pH 8 no ensaio F-4-2, que tem menos alcalinidade (Figura 35).

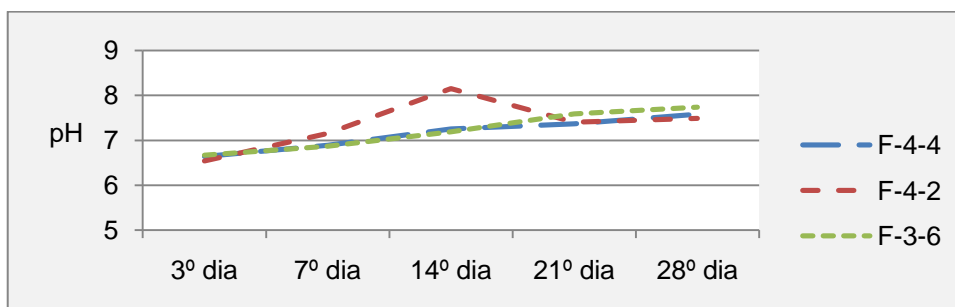


Figura 35 - pH nos ensaios com FORSU – Fase III

A biomassa presente nos final destes ensaios com FORSU também é muito semelhante entre eles (Figura 36).

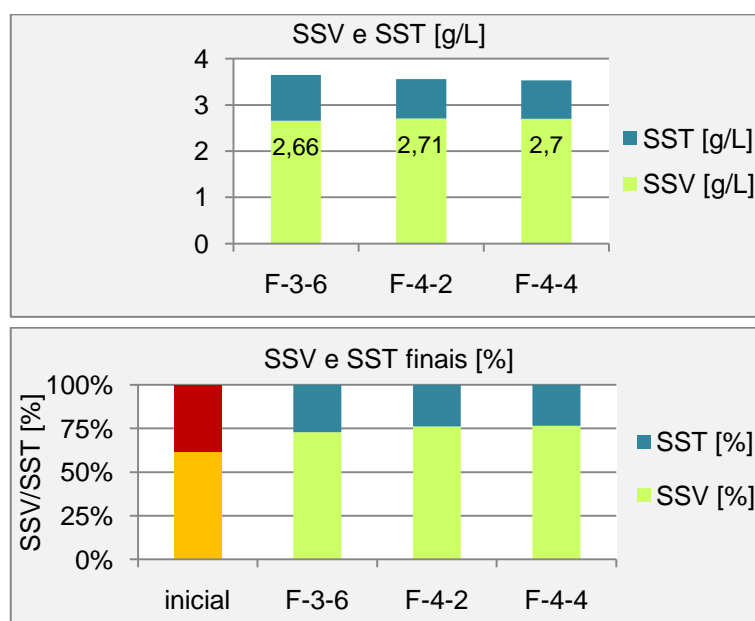


Figura 36 – SSV e SST finais nos ensaios com FORSU - Fase III

O ensaio com FORSU, rácio F/M=4 e alcalinidade de 4 gHCO₃⁻/L (F-4-4) demonstrou ter algum potencial acidogénico logo nos primeiros dias (Figura 34(a)), seguido do seu consumo e consequentemente subida do pH .

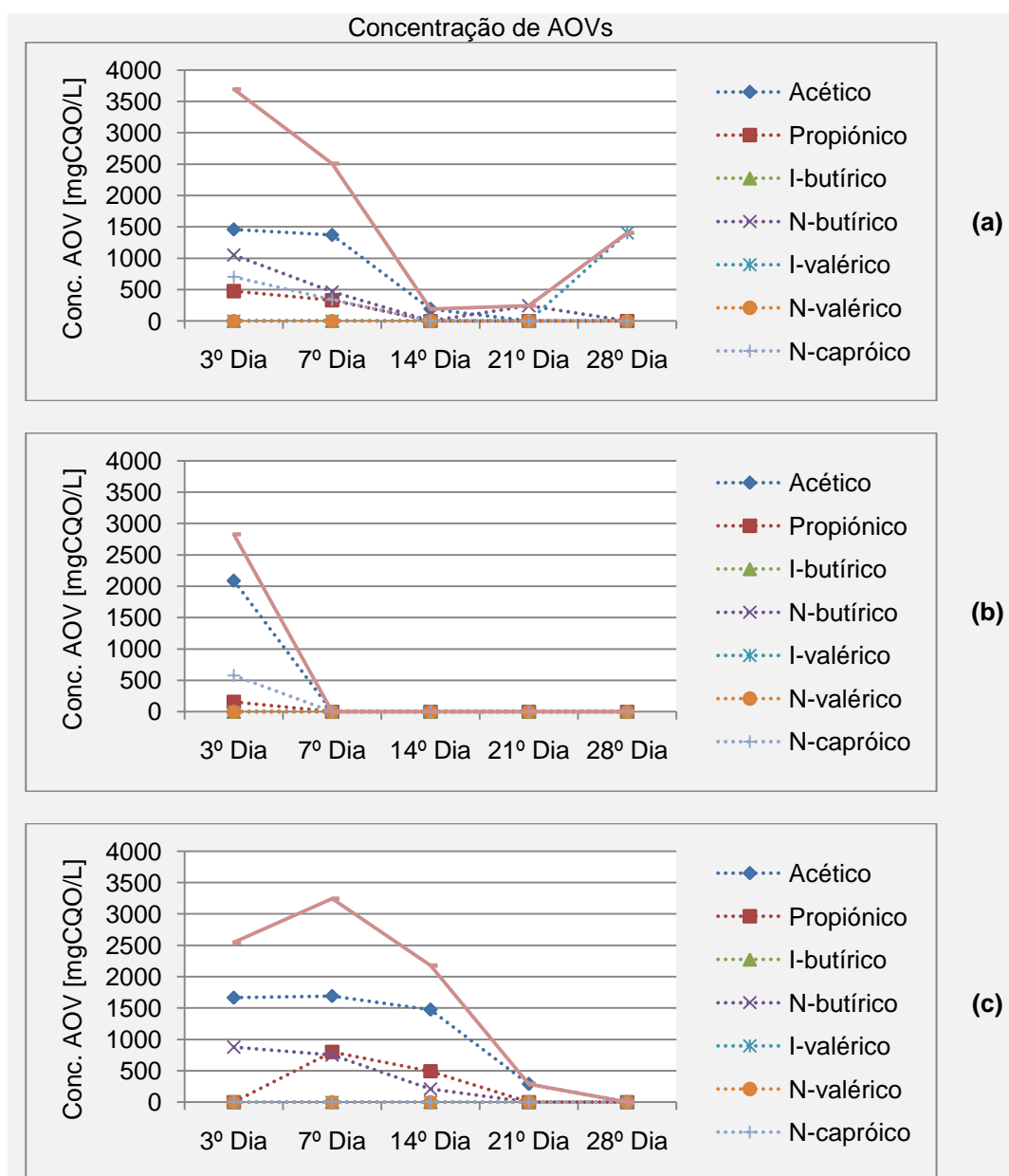


Figura 37 – Concentração de AOVs nos ensaios com FORSU

a – Razão F/M= 4 e alcalinidade 4 gHCO₃⁻/L (F-4-4); **b** – Razão F/M=4 e alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L (F-4-2); **c** – Razão F/M=3 e alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L (F-3-6).

O ensaio F-4-2 (figura 37(b)) produziu logo ao terceiro dia quantidades moderadas de AOVs total, principalmente de ácido acético. E neste caso pode-se dizer, uma vez mais, que a subida do pH impediu que se registassem valores mais elevados e causou até valores nulos em quatro análises consecutivas.

O ensaio F-3-6 (Figura 37(c)) foi mais lento a atingir o pico de concentração de AOVs total em relação ao ensaio F-4-4 (figura 37(a)) atingindo um valor mais baixo. No ensaio F-3-6 (Figura 37(c)), o consumo de AOVs é mais lento.

A FORSU também poderá ser um bom candidato a substrato para otimizar a acidogénese e para produzir AOVs, mas as suas condições de operação precisam de ser melhor estudadas.

5.3.5. EFLUENTE DE LAGARES DE AZEITE

Uma vez mais, no ensaio com menos alcalinidade, L-4-2, houve menor estabilidade nos valores de pH, em relação ao ensaio com mais alcalinidade, L-4-4 (Figura 38).

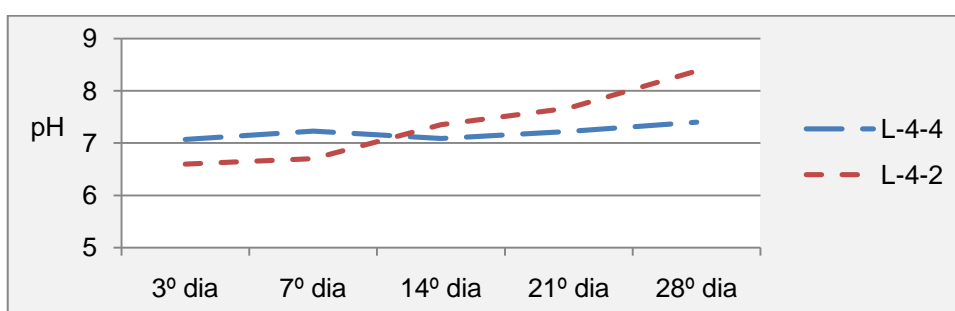


Figura 38 - pH nos ensaios com efluente de lagares de azeite – Fase III

Como se pode ver na Figura 39, a biomassa (SSV) no final de cada ensaio é bastante semelhante.

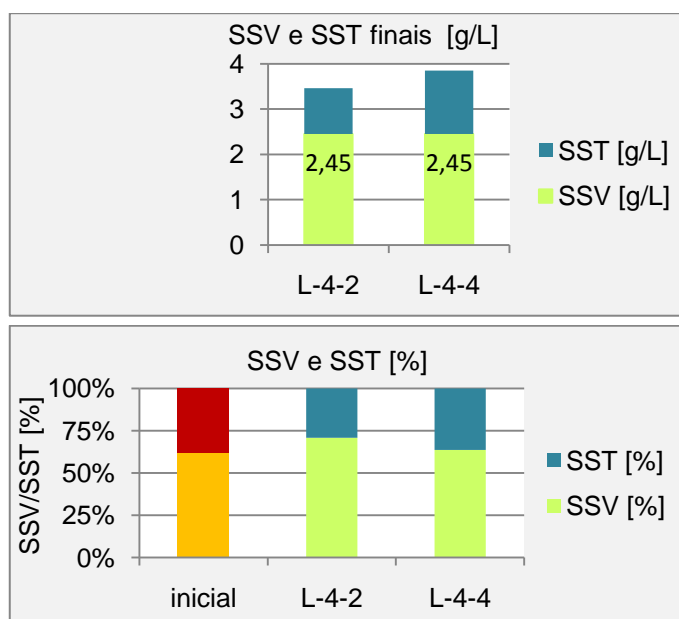
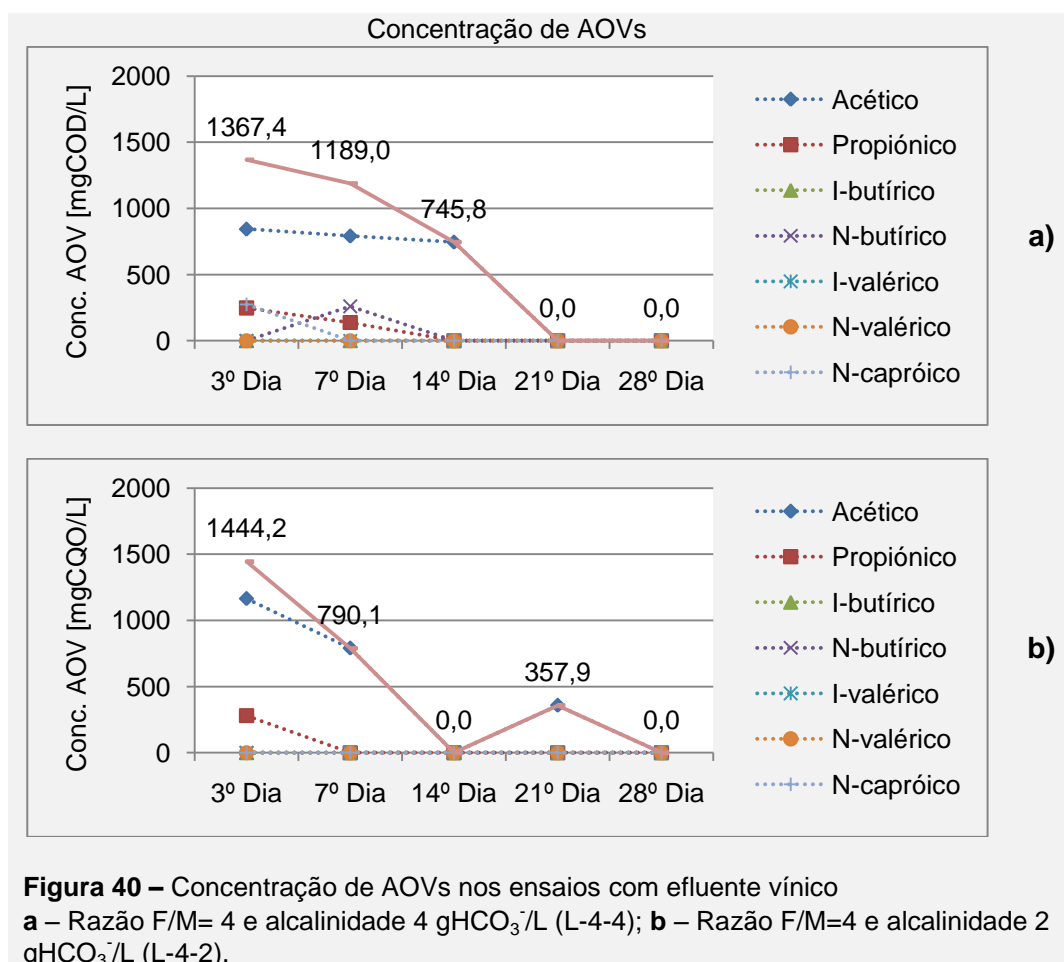


Figura 39 – SSV e SST nos ensaios com efluente de lagares de azeite - Fase III

Este substrato é aquele que demonstra um menor potencial acidogénico, observaram-se valores mais baixos de AOVs total em todas as análises, sempre inferiores a 1500 mgCQO/L. Neste caso também há consumo de AOVs, mas de forma mais gradual (Figura 40).



5.3.6. SEM SUBSTRATO

Foram feitos 3 ensaios em que não se adicionou substrato, mas em que se adicionou alcalinidade, tal como nos ensaios anteriores.

Os valores de pH ao longo das quatro semanas foi sempre muito linear nos 3 (três) ensaios (Figura 41).

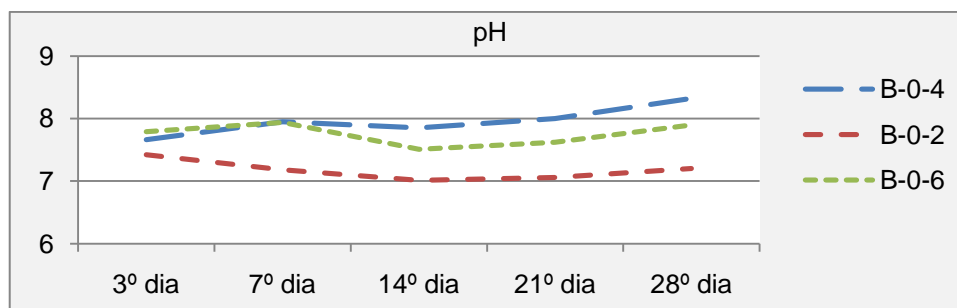


Figura 41 – pH nos ensaios sem substrato (brancos) – Fase III

Estes ensaios são os únicos que registam queda da biomassa (Figura 42), o que se deve naturalmente à ausência de substrato. O ensaio com alcalinidade de 2 gHCO₃⁻/L, que tem o pH mais próximo da neutralidade, foi aquele em que houve menor diminuição da biomassa.

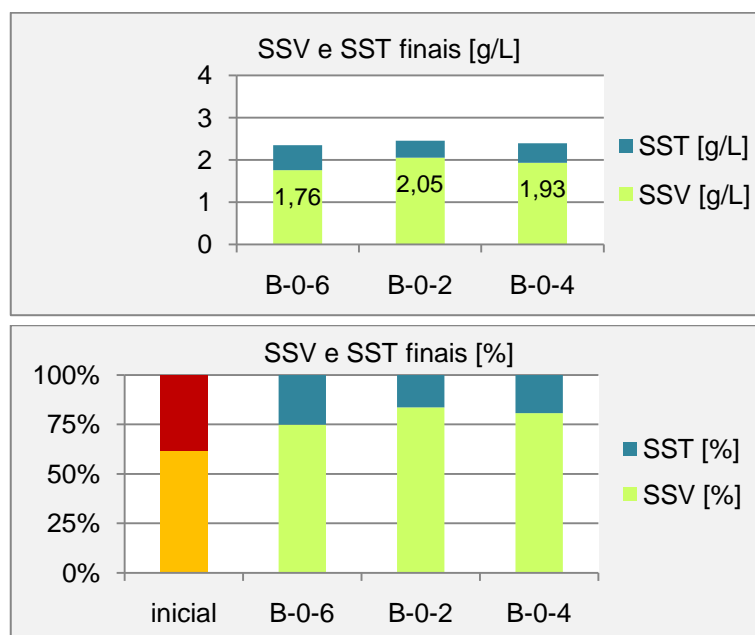
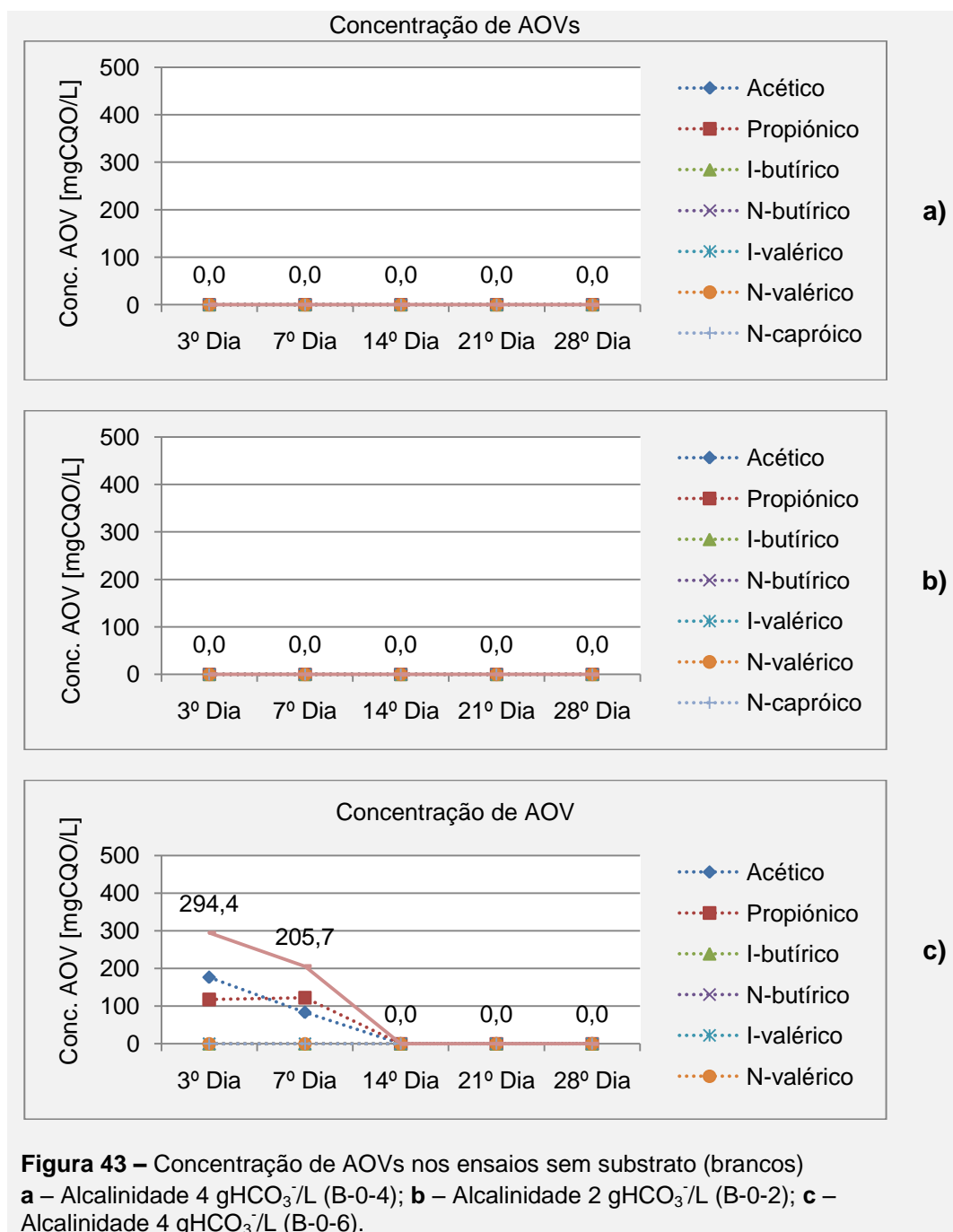


Figura 42 – SSV e SST finais nos ensaios sem substrato (brancos) - Fase III

Os ensaios sem substrato confirmam o que já se esperava. Não produziram ácidos, na generalidade. nenhuns ácidos existem no ensaio com alcalinidade de 4 gHCO₃⁻/L (Figura 43(a)) nem no ensaio com alcalinidade de 2 gHCO₃⁻/L (Figura 43(b)).



Este último ensaio sem substrato produziu quantidades irrelevantes de AOVs (Figura 43(c)). Mas permite deduzir que alcalinidade elevada (6 gHCO₃⁻/L) favorece a produção de AOVs nas situações em que a alimentação é escassa.

5.3.1. GRAU DE ACIDIFICAÇÃO NOS VÁRIOS SUBSTRATOS - FASE III

Para facilitar a comparação do grau de acidificação, os resultados dos vários substratos estão apresentados na Figura 44.

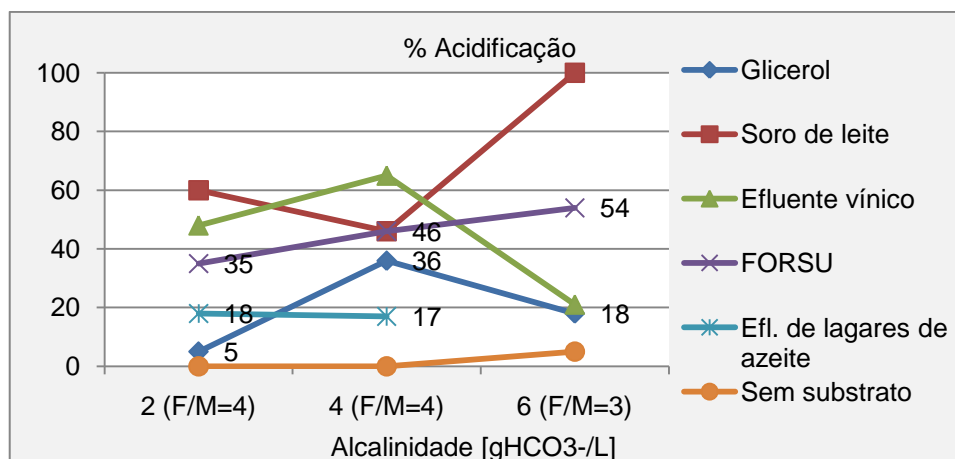


Figura 44 – Grau de acidificação dos vários substratos

Nestas condições operatórias, o soro de leite, o efluente vínico e a FORSU mostraram ser os substratos mais facilmente acidificáveis. O soro de leite atingiu 100% de acidificação num dos ensaios. O efluente vínico também se encontra entre os mais facilmente acidificáveis, atingindo os 65% de Acidificação. Uma característica particular verificada nos ensaios com este substrato é que o consumo de AOVs é menos significativo e a quantidade destes mantêm-se durante semanas. A acidificação da FORSU varia de 35% a 54%, mostrando pouca influência da alcalinidade adicionada, valores próximos dos atingidos com efluente vínico. No entanto com a FORSU à grandes oscilações nas concentrações de AOVs ao longo dos 30 dias. O glicerol e o efluente de lagares de azeite são claramente os substratos menos acidificáveis, com valores que atingem os 36% e os 18%, respectivamente.

6. CONCLUSÕES

6.1. CONCLUSÕES

6.1.1. INIBIÇÃO DA METANOGENÉSE – FASE I

Pelos resultados da Fase I, onde não se adicionou qualquer substrato, conclui-se que 1mM BES/L inibiu totalmente metanogénese em ambos os inóculos utilizados. Nas fases II e III, em que foram utilizados diferentes substratos, comprova-se a eficiência desta concentração. Apenas em dois ensaios com o substrato efluente vínico se verificou repetidamente alguma produção de metano (Tabela A.20, em Anexo).

6.1.2. OPTIMIZAÇÃO DA ACIDOGÉNESE – FASE II

Os resultados da Fase II, em que se utilizou o substrato soro de leite, indicam que a produção de AOVs total é mais significativa nos casos com maior rácio F/M, ou seja, rácio F/M igual a quatro (8 gCQO/L de substrato). Mas se se tiver em conta o grau de acidificação, a superfície de resposta da Figura 24 indica que é no rácio F/M=2 e alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L que se obtêm os melhores resultados.

Pela metodologia de superfície de resposta verifica-se que o rácio F/M igual a 4 (quatro) e alcalinidade de 2 gHCO₃⁻/L são as condições mais adequadas para a acidogénese (produção de AOVs total). De facto, o melhor resultado experimental foi obtido no ensaio com estas condições

Em todos os ensaios desta fase, independentemente da razão F/M e da alcalinidade, apenas 3 (três) dos 7 (sete) ácidos analisados atingiram valores acima de 1000 mgCQO/L. São eles o Ácido Acético, o N-butírico e o N-capróico.

A alcalinidade também demonstrou ter influência nos resultados. Nos ensaios com o rácio F/M de 1 a 3 houve maior produção de AOVs total com alcalinidade de 6 gHCO₃⁻/L. Excepção para os ensaios com o rácio F/M igual a 4 (quatro) onde se obteve o melhor resultado com 2 gHCO₃⁻/L de alcalinidade.

Apesar de haver maior produção nos ensaios com maior quantidade de substrato, pela superfície de resposta para a percentagem de acidificação da Figura 24 conclui-se que é nos ensaios com menos substrato (rácio F/M mais baixo), que se encontram as situações com melhor rendimento em termos de produção de AOVs. Os dois melhores resultados experimentais correspondem ao ensaio com razão F/M=1 e alcalinidade 6 gHCO₃⁻/L que atingiu 76% de acidificação e ao ensaio com razão F/M=4 e alcalinidade 2 gHCO₃⁻/L que atingiu 78%.

6.1.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ACIDOGÉNICO DE VÁRIOS SUBSTRATOS – FASE III

Na Fase III adoptaram-se as três melhores condições de acidogénese encontradas na fase anterior, Fase II, com o substrato soro de leite, para testar o potencial acidogénico de diferentes substratos. Verifica-se que com os substratos soro de leite, efluente vínico e FORSU se atinge geralmente um grau de acidificação acima de 40% nas situações de menor alcalinidade (2 e 4 gHCO₃⁻/L) e razão F/M=4. Na situação de maior alcalinidade (6 gHCO₃⁻/L) e razão F/M=3 verifica-se uma melhoria no grau de acidificação do soro de leite que atinge 100% e da FORSU, mas uma diminuição na acidificação do efluente vínico. Com glicerol o grau de acidificação não ultrapassa em nenhuma das condições os 40%, e o efluente de lagares de azeite não atinge nunca os 20%, indiciando que estes são os substratos mais difíceis de degradar.

Geralmente o pico de produção de AOVs é atingido numa semana, de modo análogo a outros estudos, como o de Mason e Mulcahy (2003), também observaram um máximo de concentração de AOVs em menos de 10 (dez) dias usando como substrato água residual de estrume.

6.2. LIMITAÇÕES DO TRABALHO E SUGESTÕES

Durante a execução deste trabalho encontraram-se algumas condicionantes que podem ser evitadas ou, pelo menos, tidas em consideração em trabalhos futuros.

Nas três fases deste estudo foram utilizadas lamas (inóculo) provenientes do digestor anaeróbio de uma ETAR municipal (Simria Sul), denominadas aqui por “Simria”. E de uma fase para a seguinte são utilizados os resultados pressupondo que as lamas são as iguais. Porém, apesar de as lamas terem a mesma origem não tem exactamente as mesmas características, o que pode ter interferências indesejáveis nos resultados. Em todas foram analisados os SSV e foi sempre utilizada a mesma quantidade de biomassa, mas teria sido melhor utilizar sempre a mesma amostra, e mantê-la a 4º C.

Em vários ensaios das Fases II e III a concentração de ácidos orgânicos voláteis diminui logo a partir da primeira semana. Seria conveniente adoptar uma estratégia de impedir que estes AOVs sejam consumidos uma vez que o objectivo é conseguir o máximo de AOVs (e com a qualidade desejada).

Seria vantajoso realizar análises aos AOVs com maior frequência. No entanto com o método utilizado torna-se pouco viável. Seria vantajoso para saber com mais rigor como varia a concentração de AOVs ao longo do tempo, qual o máximo de atingido e quando este é atingido. Com análises (apenas) semanais há uma grande margem de erro. É pouco viável porque implica a perda de biogás e consequentemente menor controlo sobre este, implica o arejamento do reactor (anaeróbio) e ainda perturbação no volume

reaccional, na temperatura e agitação. Além disto, a análise de cada amostra de AOVs também despende bastante tempo.

Outra condicionante para os resultados do biogás (nas Fases II e III) foi o facto de as garrafas Oxitop® estarem fechadas com uma película de parafilme que, devido às variações de pressão no reactor e à temperatura dentro da estufa, por vezes se rompe perdendo o biogás existente. Isto também implicou uma vigilância mais atenta, principalmente nos primeiros dias para substituir as películas danificadas e minimizar perdas de biogás. Esta condicionante deve-se ao facto de não haver espaço na estufa para os sensores de pressão que normalmente fecham estas garrafas, conforme se verifica na Figura 2.

Cada ensaio realizado é único, sem réplicas. Os resultados teriam melhor validade se os ensaios fossem realizados com réplicas. Os inóculos não são absolutamente homogéneos o que reforça o interesse em ter réplicas. As análises aos AOVs em triplicado também dariam mais fiabilidade aos resultados.

O pH foi medido à temperatura ambiente, sem medição da temperatura devido à falta deste dado no medidor de pH, o que adiciona erro aos resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeline S.M. Chu^a*, Hiroo Takabatake^b, Hiroyasu Satoh^a, Takashi Mino. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. *Water Research* 37, 3602–3611
- Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R., Reis, M.A.M., (2007). Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J. Biotechnol.* 130, 411–421.
- Albuquerque, M.G.E., Torres, C., Reis, M.A.M., (2010a). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water Res.* 44, 3419–3433.
- Albuquerque, M.G.E., Concas, S., Bengtsson, S., Reis, M.A.M., (2010b). Mixed culture polyhydroxyalkanoates production from sugar molasses: the use of a 2-stage CSTR system for culture selection. *Bioresour. Technol.* 101, 7112–7122.
- Albuquerque, M.G.E., Martino, V., Pollet, V., Avérous, L., Reis, M.A.M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acids (VFAs)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties
- Anderson, A.J., Dawes, E.A., (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiol. Rev.* 54 450–472.
- APHA - American Public Health Association, (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. APHA, Washington DC, USA.
- Beccari, M., Bonemazzi, F., Majone, M., Riccardi, C., (1996). Interaction between acidogenesis and methanogenesis in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents. *Wat. Res.* Vol. 30, No. 1, pp. 183-189.
- Beccari, M., Bertin, L., Dionisi, D., Fava, F., Lampis, S., Majone, M., Valentino, F., Vallini, G., Villano, M., (2009). Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic–aerobic process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 901–908.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., Welander, T., (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresour. Technol.* 99, 509–516.

- Bengtsson, S., Pisco, A.R., Johansson, P., Lemos, P.C., Reis, M.A.M., (2010b). Molecular weight and thermal properties of polyhydroxyalkanoates produced from fermented sugar molasses by open mixed cultures. *J. Biotechnol.* 147, 172–179.
- Bouwer, E.J. & McCarty, P.L. (1983). Effects of 2-Bromoethanesulfonic Acid and 2-Chloroethanesulfonic Acid on Acetate Utilization in a Continuous-Flow Methanogenic Fixed-Film Column. *Applied and Environmental, Apr.* 1983, p. 1408-1410
- Braunegg G, Lefebvre G, Genser KF. (1998). Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J Biotechnol.*
- Byrom D. (1987). Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends Biotechnol* ;5:246 /50.
- Capela, I. F., Azeiteiro, C., Arroja, L. & Duarte, A. C. (1999) Effects of pre-treatment (composting) on anaerobic digestion of primary sludges from a bleached kraft pulp mill. Second international symposium on anaerobic digestion of solid wastes. Barcelona, Spain.
- Chen, G.Q., Xu, J., Wu, Q., Zhang, Z.M., Ho, K.P. (2001). Synthesis of copolyesters consisting of medium-chain-length β -hydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317, *React. Funct. Polym.* 48 107–112.
- Coats, E.R., Gregg M., Crawford R.L. (2011) Effect of organic loading and retention time on dairy manure fermentation, *Bioresource Technology* 102; 2572–2577.
- Cohen, A., Zoetemeyer, R.J., Deursen, A., Andel, J.G. (1979). Anaerobic digestion of glucose with separated acid production and methane formation, *Water Research*.
- Crank, M., Patel, M., 2005. Techno-economic Feasibility of Largescale Production of Bio based Polymers in Europe. European Commission
- Dias, J.M.L., Lemos, P.C., Serafim, L.S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M.G.E., Ramos, A.M., Oliveira, R., Reis, M.A.M., (2006). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromol Biosci.* 6, 885e906.
- Dionisi, D., Carucci, G., Petrangeli, M., Papini, P., Riccardi, C., Majone, M., Carrasco, F., (2005). Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water Res.* 39, 2076–2084.
- Dionisi, D., Majone, M., Levantesi, C., Bellani, A., Fuoco, A., (2006). Effect of feed length on settleability, substrate uptake and storage in a sequencing batch reactor treating an industrial wastewater. *Environ. Technol.* 27, 901–908.

- Flor, A.P., Comportamento de reactores anaeróbios tratando a fracção orgânica dos resíduos sólidos urbanos (2006), Universidade de Aveiro
- Gurieff, N., Lant, P., (2007). Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. *Biores. Technol.* 98, 3393–3403.
- Johnson, K., Kleerebezem, R., Muyzer, G., Gand, M.C.M., van Loosdrecht, (2009). Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. *Biomacromolecules* 10, 670–676.
- Khanna, S., Srivastava, A.K., 2005. Recent advances in microbialpolyhydroxyalkanoates. *Process Biochem.* 40, 607e619.
- Kim, B.S., 2000. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme Microb. Technol.* 27 (10), 774-777. 2076-2084.
- Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., (2007). Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (3), 207e212.
- Lee S.Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoates production in bacteria. *TIBTECH.*
- Lee, S.Y., Choi, J., Wong, H.H., (1999). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 31–36.
- Lee, J.W., Peterson, D.L., Stickney, A.R. (1989). Anaerobic Pulp and Paper Mill Wastewaters, Environmental Conference.
- Lee, W.H., Loo, C.-Y., Nomura, C.T., Sudesh, K., 2008. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresour. Technol.* 99, 6844e6851.
- Lemos, P.C., Serafim, L.S., Reis, M.A.M., (2006). Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *J. Biotechnol.* 122, 226–238.
- Madison, L.L., Huisman, G.W., (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 21–53.
- Mason, I.G., Mulcahy, J., 2003. Volatile fatty acid production from farm dairy wastewater. *Trans. ASAE* 46, 819–824.
- McCarty P.L., (1964). Anaerobic waste treatment fundamentals – part one: chemistry and microbiology; part two: environmental requirements and control, part three: toxic materials and their control, part four: process design, Public Works

- Norton, I.T., Frith, W.J., (2001). Microstruture design in mixed biopolymer composites, Unilever Research.
- Patel, M., Gapes, D.J., Newman, R.H., Dare, P.H., (2009). Physico-chemical properties of polyhydroxyalkanoate produced by mixed-culture nitrogen-fixing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 545–555.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Kalia, R.V.C., (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour. Technol.* 87, 137e146.
- Rehm, B.H.A, Steinbuchel, A., (1999). Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required forPHAsynthesis, *Int. J. Biol. Macromol.* 25 3–19.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Oliveira, R., Reis, M.A.M., (2004). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 87, 145–160.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Albuquerque, M.G.E., Reis, M.A.M., (2008a). Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl. Microb. Biotechnol.* 81 (4).
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Torres, C., Reis, M.A.M., Ramos, A.M., (2008b). The influence of process parameters on the characteristics of polyhydroxyalkanoates producedby mixed cultures. *Macromol. Biosci.* 8, 355–366.
- Siles, J.A., Martin, M.A., Chica A.F., Martín, A. (2009). Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing, *Bioresource Technology* 100; 5609–5615
- Siles, J.A., Martin, M.A., Chica A.F., Martín, A. (2010). Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing *Bioresource Technology* 101; 6315–6321
- Sudesh, K., Abe, H, Doi, Y., (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters, *Prog. Polym. Sci.* 25 1503–1555.
- Takabatake, H, Satoh, H., Mino, T., Matsuo, T., (2000). Recovery of biodegradable plastics from activated sludge process. *Water Sci. Technol.* 42, 351–356.
- Tchobanoglous G., Burton F.L., Stensed H.D., (2003). Wastewater engineering – treatment and reuse/ MetCalf and Eddy, Inc., 4ª edição, McGraw Hill.
- Vieira, R,M,G (2009). Contribuição para o estudo do tratamento de efluentes da indústria vinícola.

- Villano, M., Beccari, M., Dionisi, D., Lampis, S., Miccheli, A., Vallini, G., Majone, M., (2010). Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. *Process Biochem.* 45, 714–723.
- Wegen, V. R.J., Ling, Y., Middelberg, A.P.J., (1998). Industrial production of polyhydroxyalkanoates using *Escherichia coli*: an economic analysis. *Trans IChemE* 76 (part A), 417.
- Wijekoon K.C., Visvanathan, C, Abeynayaka, A (2011) Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of a two-stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor. *Bioresource Technology*
- Yamane, T (1993).. Yield of poly-D-(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. *Biotechnol Bioeng*;41:165/70.
- Yu, J., (2001). Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *Journal of Biotechnology* 86 105–112

ANEXOS

INIBIÇÃO DA METANOGÉNESE - FASE I

CARACTERIZAÇÃO DOS INÓCULOS

Tabela A.5 – Sólidos SST e SSV dos Inóculos “Simria” I e “Salgueiro”

Inóculo	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
"Simria" I	16,28 ± 0,39	9,55 ± 0,09	58,66
"Salgueiro"	16,87 ± 0,57	7,60 ± 0,32	45,05

COMPOSIÇÃO INICIAL DETALHADA DOS ENSAIOS PREPARADOS – FASE I

Concentração da solução de BES: 63,303 g/L (M=211,01 g/mol)

Biomassa do inóculo “Simria” I: 9,55 gSSV/L (tabela A.1)

Biomassa do inóculo “Salgueiro”: 7,60 gSSV/L (tabela A.1)

Biomassa em cada ensaio: 2 gSSV/L

Nutrientes: Os volumes indicados na tabela A.2 correspondem soluções diluídas a 10% das soluções descritas na tabela 1.

Volume reacional: 150 mL

Tabela A.6 - Composição inicial de cada ensaio em volume - Fase I

Inóculo	mM BES/L	BES [mL]	Inóculo [mL]	V _{Mac I} [mL]	V _{Mac II} [mL]	V _{Mic} [mL]	H ₂ O [mL]
“Simria” I	0	0,0	31,4	1,5	1,5	1,5	114,1
	1	0,5	31,4	1,5	1,5	1,5	113,6
	2	1,0	31,4	1,5	1,5	1,5	113,1
	6	3,0	31,4	1,5	1,5	1,5	111,1
	20	10,0	31,4	1,5	1,5	1,5	104,1
	50	25,0	31,4	1,5	1,5	1,5	89,1
“Salgueiro”	0	0,0	39,5	1,5	1,5	1,5	106,0
	1	0,5	39,5	1,5	1,5	1,5	105,5
	2	1,0	39,5	1,5	1,5	1,5	105,0
	6	3,0	39,5	1,5	1,5	1,5	103,0
	20	10,0	39,5	1,5	1,5	1,5	96,0
	50	25,0	39,5	1,5	1,5	1,5	81,0

*SÓLIDOS NO FINAL DA DIGESTÃO***Tabela A.7** – SST e SSV finais nos ensaios com Inóculo “Sagueiro” I

mM BES/L	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
0	4,30 ± 0,19	2,06 ± 0,21	47,91
1	5,43 ± 0,02	2,87 ± 0,06	52,76
2	4,46 ± 0,13	2,13 ± 0,17	47,68
6	4,18 ± 0,23	1,92 ± 0,17	45,93
20	5,09 ± 0,03	2,59 ± 0,04	50,85
50	5,53 ± 0,03	2,87 ± 0,25	51,87

Tabela A.8 – SST e SSV finais nos ensaios com Inóculo “Simria”

mM BES/L	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
0	3,24 ± 0,12	2,39 ± 0,20	70,37
1	3,39 ± 0,13	2,01 ± 0,15	59,45
2	3,60 ± 0,05	2,15 ± 0,13	59,81
6	3,53 ± 0,08	2,08 ± 0,13	58,98
20	3,51 ± 0,10	2,05 ± 0,22	58,44
50	4,60 ± 0,26	2,86 ± 0,28	62,17

OPTIMIZAÇÃO DA ACIDOGÉNESE COM SORO DE LEITE - FASE II*CARACTERIZAÇÃO DO INÓCULO***Tabela A.9** – SST e SSV do Inóculo “Simria” II

Inóculo	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
"Simria" II	20,67 ± 0,25	14,20 ± 0,19	68,69

COMPOSIÇÃO INICIAL DETALHADA DOS ENSAIOS PREPARADOS – FASE II

CQO soro de leite: 29,36 gCQO/L

Biomassa do inóculo “Simria” II: 14,20 gSSV/L (Tabela A.5)

Biomassa em cada ensaio: 2 gSSV/L

Concentração de bicarbonato de sódio (NaHCO₃): 50g/L

Nutrientes: Os volumes indicados na tabela A.6 correspondem soluções diluídas a 10% das soluções descritas na tabela 1.

Concentração da solução de BES: 16,88 g/L (M=211,01 g/mol)

Volume reacional: 200 mL

Tabela A.10 - Composição inicial de cada ensaio em volume - Fase II

Ensaio	Soro [mL]	Inóculo “Simria” II [mL]	NaHCO ₃ [mL]	V _{Mac I} [mL]	V _{Mac II} [mL]	V _{Mic} [mL]	BES [mL]	H ₂ O [mL]
E-1-0	13,6	28,2	0,00	2,0	2,0	2,0	2,5	152,21
E-1-2	13,6	28,2	8,00	2,0	2,0	2,0	2,5	144,21
E-1-4	13,6	28,2	16,00	2,0	2,0	2,0	2,5	136,21
E-1-6	13,6	28,2	24,00	2,0	2,0	2,0	2,5	128,21
E-2-0	27,3	28,2	0,00	2,0	2,0	2,0	2,5	138,58
E-2-2	27,3	28,2	8,00	2,0	2,0	2,0	2,5	130,58
E-2-4	27,3	28,2	16,00	2,0	2,0	2,0	2,5	122,58
E-2-6	27,3	28,2	24,00	2,0	2,0	2,0	2,5	114,58
E-3-0	40,9	28,2	0,00	2,0	2,0	2,0	2,5	124,95
E-3-2	40,9	28,2	8,00	2,0	2,0	2,0	2,5	116,95
E-3-4	40,9	28,2	16,00	2,0	2,0	2,0	2,5	108,95
E-3-6	40,9	28,2	24,00	2,0	2,0	2,0	2,5	100,95
E-4-0	54,5	28,2	0,00	2,0	2,0	2,0	2,5	111,33
E-4-2	54,5	28,2	8,00	2,0	2,0	2,0	2,5	103,33
E-4-4	54,5	28,2	16,00	2,0	2,0	2,0	2,5	95,33
E-4-6	54,5	28,2	24,00	2,0	2,0	2,0	2,5	87,33

ANÁLISE AO BIOGÁS

O equipamento utilizado forneceu valores relativamente à percentagem (v/v) de metano (CH₄), de dióxido de carbono (CO₂) e de outros componentes gasosos (N₂, H₂, H₂S, etc.). Desprezando os outros componentes gasosos e considerando apenas o CH₄ e o CO₂, obteve-se os valores apresentados nas tabelas A.7, A.8, A.9 e A.10.

Tabela A.11 - Biogás nos ensaios com razão F/M=1 e alcalinidades de 0 a 6 g/L – Fase II

Dia	Ensaio E-1-0		Ensaio E-1-2		Ensaio E-1-4		Ensaio E-1-6	
	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]
7	0	100	0	100	0	100	x	
14		x	0	100	0	100	14	86
21		x	0	100		x	0	100
28	0	100	0	100	0	100	0	100

x - perda do biogás por perfuração da película de parafilme que fecha as garrafas Oxitop®

Tabela A.12 - Biogás nos ensaios com razão F/M=2 e alcalinidades de 0 a 6 g/L – Fase II

Dia	Ensaio E-2-0		Ensaio E-2-2		Ensaio E-2-4		Ensaio E-2-6	
	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]
7	0	100	0	100	0	100	0	100
14	0	100	0	100	0	100	0	100
21	0	100	62	38	0	100	0	100
28	0	100		x	0	100	0	100

x - perda do biogás por perfuração da película de parafilme que fecha as garrafas Oxitop®

Tabela A.13 - Biogás nos ensaios com razão F/M=3 e alcalinidades de 0 a 6 g/L – Fase II

Dia	Ensaio E-3-0		Ensaio E-3-2		Ensaio E-3-4		Ensaio E-3-6	
	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]
7	0	100	0	100	0	100	0	100
14		x	0	100	0	100	13	87
21	0	100	0	100	0	100	30	70
28	0	100	9	91	0	100	27	73

x - perda do biogás por perfuração da película de parafilme que fecha as garrafas Oxitop®

Tabela A.14 - Biogás nos ensaios com razão F/M=4 e alcalinidades de 0 a 6 g/L – Fase II

Dia	Ensaio S-4-0		Ensaio S-4-2		Ensaio S-4-4		Ensaio S-4-6	
	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]
7	0	100	0	100	0	100	x	
14	0	100	0	100	0	100	0	100
21	0	100	0	100	0	100	37	63
28	0	100	0	100	0	100	0	100

x - perda do biogás por perfuração da película de parafilme que fecha as garrafas Oxitop®

SÓLIDOS FINAIS

Tabela A.15 – Sólidos final nos ensaios F/M=1 - Fase II

Ensaio	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
E-1-0	2,61 ± 0,12	1,79 ± 0,15	68,80
E-1-2	2,55 ± 0,11	1,59 ± 0,15	62,14
E-1-4	2,47 ± 0,22	1,46 ± 0,02	59,03
E-1-6	2,78 ± 0,45	1,93 ± 0,11	69,54

Tabela A.16 – Sólidos final nos ensaios F/M=2 - Fase II

Ensaio	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
E-2-0	2,73 ± 0,04	2,03 ± 0,013	74,39
E-2-2	2,53 ± 0,12	1,73 ± 0,17	68,42
E-2-4	2,37 ± 0,17	1,75 ± 0,13	73,88
E-2-6	2,46 ± 0,20	2,13 ± 0,03	80,15

Tabela A.17 – Sólidos final nos ensaios F/M=3 - Fase II

Ensaio	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
E-3-0	3,55 ± 0,08	2,58 ± 0,02	72,74
E-3-2	3,31 ± 0,08	2,29 ± 0,08	69,01
E-3-4	2,69 ± 0,13	1,43 ± 0,09	53,48
E-3-6	3,65 ± 0,06	2,31 ± 0,03	63,44

Tabela A.18 – Sólidos final nos ensaios F/M=4 - Fase II

Ensaio	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
E-4-0	3,17 ± 0,14	2,43 ± 0,12	76,84
E-4-2	3,93 ± 0,11	2,63 ± 0,19	67,06
E-4-4	3,13 ± 0,14	1,89 ± 0,08	60,34
E-4-6	3,41 ± 0,24	1,71 ± 0,25	50,00

POTENCIAL ACIDOGÉNICO DE VÁRIOS SUBSTRATOS - FASE III*CARACTERIZAÇÃO DO INÓCULO***Tabela A.19** – Sólidos SST e SSV do Inóculo “Simria” II

Inóculo	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
"Simria" III	17,39 ± 0,84	10,73 ± 0,15	61,73

*CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS***Tabela A.20** - Caracterização dos substratos (CQO) pelo método refluxo aberto

Substrato	m [g]	V _{amostra} [mL]	V _{FAS} [mL]	CQO [g/L]	CQO [g/kg]	CQO _{med} [g/Kg]
FORSU	0,0473	50	18,60	345	365	380
	0,0506	50	17,40	396	391	
	0,0508	50	17,50	392	385	
Glicerol	0,0252	50	2,65	1020	2024	2030
	0,0248	50	2,85	1012	2040	
	0,0251	50	2,70	1018	2028	
Branco	0	50	26,75	---	---	---

Molaridade do sulfato ferroso amoniacal (FAS): 0,26455 mol/L

Fórmula de Cálculo conforme Standard Methods (APHA 1999):

$$CQO \text{ como } \frac{mgO_2}{L} = \frac{(A - B) * M * 8000}{V_{amostra} [mL]}$$

Onde:

A = mL FAS usado no branco,

B = mL FAS usado na amostra,

M = molaridade do FAS, e

8000= peso miliequivalent de oxigénio X 1000mL/L

COMPOSIÇÃO INICIAL DETALHADA DOS ENSAIOS PREPARADOS – FASE III

CQO soro de leite: 31,78 gCQO/L

CQO efluentes de lagares de azeite: 55,7 gCQO/L

CQO glicerol: 32 gCQO/L (0,788g diluídas em 50ml de H₂O)

CQO efluente vinícola: 26,92 gCQO/L

CQO FORSU: 32 gCQO/L (4,21g diluídas em 50ml de H₂O)

Biomassa do inóculo “Simria” III: 10,73 gSSV/L (Tabela A.15)

Biomassa em cada ensaio: 2 gSSV/L

Concentração de bicarbonato de sódio (NaHCO₃): 50g/L

Nutrientes: Os volumes indicados na tabela A.17 correspondem soluções diluídas a 10% das soluções descritas na tabela 1.

Concentração da solução de BES: 16,88 g/L (M=211,01 g/mol)

Volume reacional: 200 mL

Tabela A.21 - Composição inicial de cada ensaio em volume - Fase III

Ensaio	Substrato	F/M	Alk [gHCO ₃ -L]	Substrato [mL]	Inóculo [mL]	NaHCO ₃ [mL]	V _{Mac I} [mL]	V _{Mac II} [mL]	V _{Mic} [mL]	BES [mL]	H2O [mL]
S-4-4	Soro	4	4	50,34	37,28	16,0	2,0	2,0	2,0	2,5	87,88
S-4-2	Soro	4	2	50,34	37,28	8,0	2,0	2,0	2,0	2,5	95,88
S-3-6	Soro	3	6	37,76	37,28	24,0	2,0	2,0	2,0	2,5	92,46
L-4-4	Lg. Azeite	4	4	28,73	37,28	16,0	2,0	2,0	2,0	2,5	109,49
L-4-2	Lg. Azeite	4	2	28,73	37,28	8,0	2,0	2,0	2,0	2,5	117,49
G-4-4	Glicerol	4	4	50,00	37,28	16,0	2,0	2,0	2,0	2,5	88,22
G-4-2	Glicerol	4	2	50,00	37,28	8,0	2,0	2,0	2,0	2,5	96,22
G-3-6	Glicerol	3	6	37,50	37,28	24,0	2,0	2,0	2,0	2,5	92,72
V-4-4	Vinícola	4	4	59,44	37,28	16,0	2,0	2,0	2,0	2,5	78,78
V-4-2	Vinícola	4	2	59,44	37,28	8,0	2,0	2,0	2,0	2,5	86,78
V-3-6	Vinícola	3	6	44,58	37,28	24,0	2,0	2,0	2,0	2,5	85,64
F-4-4	FORSU	4	4	50,00	37,28	16,0	2,0	2,0	2,0	2,5	88,22
F-4-2	FORSU	4	2	50,00	37,28	8,0	2,0	2,0	2,0	2,5	96,22
F-3-6	FORSU	3	6	37,50	37,28	24,0	2,0	2,0	2,0	2,5	92,72
Branco	---	0	4	0,00	37,28	16,0	2,0	2,0	2,0	2,5	138,22
Branco	---	0	2	0,00	37,28	8,0	2,0	2,0	2,0	2,5	146,22
Brabco	---	0	6	0,00	37,28	24,0	2,0	2,0	2,0	2,5	130,22

ANÁLISE AO BIOGÁS

O equipamento utilizado forneceu valores relativamente à percentagem (v/v) de metano (CH₄), de dióxido de carbono (CO₂) e de outros componentes gasosos (N₂, H₂, H₂S, etc.). Desprezando os outros componentes gasosos e considerando apenas o CH₄ e o CO₂, obteve-se os valores apresentados nas tabelas A.18, A.19, A.20, A.21, A.22 e A.23.

Tabela A.22 - Biogás nos ensaios com o substrato glicerol – Fase III

Dia	Ensaio G-4-4		Ensaio G-4-2		Ensaio G-3-6	
	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]
3	0	100	0	100	0	100
7	0	100	0	100	0	100
14	0	100	0	100	0	100
21	0	100	0	100	0	100
28	28	72	0	100	0	100

Tabela A.23 - Biogás nos ensaios com o substrato soro de leite – Fase III

Dia	Ensaio S-4-4		Ensaio S-4-2		Ensaio S-3-6	
	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]
3	0	100	0	100	0	100
7	0	100	0	100	0	100
14	0	100	0	100	8	92
21	0	100	0	100	0	100
28	0	100	0	100	0	100

Tabela A.24 - Biogás nos ensaios com o substrato efluente vínico – Fase III

Dia	Ensaio V-4-4		Ensaio V-4-2		Ensaio V-3-6	
	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]
3	0	100	0	100	0	100
7	0	100	12	88	0	100
14	11	89	29	71	0	100
21	11	89	0	100	0	100
28	12	88	9	91	0	100

Tabela A.25 - Biogás nos ensaios com o substrato FORSU – Fase III

Dia	Ensaio F-4-4		Ensaio F-4-2		Ensaio F-3-6	
	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]
3	0	100	0	100	0	100
7	0	100	0	100	0	100
14	0	100	0	100	0	100
21	0	100	0	100	0	100
28	0	100	0	100	0	100

Tabela A.26 - Biogás nos ensaios com o substrato efluente de lagares azeite – Fase III

Dia	Ensaio L-4-4		Ensaio L-4-2	
	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]
3	0	100	0	100
7	0	100	0	100
14	13	87	0	100
21	10	90	0	100
28	0	100	0	100

Tabela A.27 - Biogás nos ensaios sem substrato (brancos) – Fase III

Dia	Ensaio B-4-4		Ensaio B-4-2		Ensaio B-3-6	
	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]	CH ₄ [%]	CO ₂ [%]
3	0	100	0	100	0	100
7	0	100	0	100	0	100
14	0	100	0	100	0	100
21	0	100	0	100	0	100
28	0	100	0	100	0	100

*SÓLIDOS FINAIS***Tabela A.28** – Sólidos final nos ensaios com glicerol - Fase III

Ensaio	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
G-4-4	3,16 ± 0,08	2,91 ± 0,17	91,98
G-4-2	2,95 ± 0,01	2,77 ± 0,17	93,68
G-3-6	2,65 ± 0,10	2,28 ± 0,05	86,16

Tabela A.29 – Sólidos final nos ensaios com soro de leite - Fase III

Ensaio	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
S-4-4	3,38 ± 0,16	2,48 ± 0,32	73,37
S-4-2	3,67 ± 0,16	3,12 ± 0,31	85,09
S-3-6	3,60 ± 0,31	2,87 ± 0,10	79,63

Tabela A.30 – Sólidos final nos ensaios com efluente vínico - Fase III

Ensaio	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
V-4-4	3,46 ± 0,09	3,22 ± 0,03	93,26
V-4-2	3,46 ± 0,12	2,97 ± 0,14	85,74
V-3-6	2,91 ± 0,14	2,57 ± 0,16	88,53

Tabela A.31 – Sólidos final nos ensaios com FORSU - Fase III

Ensaio	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
F-4-4	3,53 ± 0,16	2,70 ± 0,11	76,42
F-4-2	3,56 ± 0,05	2,71 ± 0,29	76,03
F-3-6	3,65 ± 0,18	2,66 ± 0,18	72,81

Tabela A.32 – Sólidos final nos ensaios com FORSU - Fase III

Ensaio	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
L-4-4	3,85 ± 0,05	2,45 ± 0,08	63,60
L-4-2	3,46 ± 0,14	2,45 ± 0,16	70,91

Tabela A.33 – Sólidos final nos ensaios com FORSU - Fase III

Ensaio	SST [g/L]	SSV [g/L]	SSV/SST [%]
B-0-4	2,39 ± 0,07	1,93 ± 0,09	80,78
B-0-2	2,15 ± 0,14	2,05 ± 0,18	95,05
B-0-6	2,35 ± 0,11	1,76 ± 0,03	74,79